

# ARTEMIN, A NOVEL NEUROTROPHIC FACTOR

**Publication number:** JP2002534957 (T)

**Publication date:** 2002-10-22

**Inventor(s):**

**Applicant(s):**

**Classification:**

- international: **A61K38/00; A61K48/00; A61P1/00; A61P19/00; A61P21/00; A61P25/02; A61P25/14; A61P25/16; A61P25/28; A61P31/00; A61P35/00; A61P9/10; C07K14/475; C07K16/22; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N5/08; C12N5/10; C12Q1/68; A61K38/00; A61K48/00; A61P1/00; A61P19/00; A61P21/00; A61P25/00; A61P31/00; A61P35/00; A61P9/00; C07K14/435; C07K16/18; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N5/08; C12N5/10; C12Q1/68; (IPC1-7): A61K38/00; A61K48/00; A61P1/00; A61P19/00; A61P21/00; A61P25/02; A61P25/14; A61P25/16; A61P25/28; A61P31/00; A61P35/00; A61P9/10; C07K14/475; C07K16/22; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N5/10; C12Q1/68**

- European: C07K14/475

**Application number:** JP20000572257T 19990929

**Priority number(s):** US19980163283 19980929; US19980108148P 19981112; US19980218698 19981222; WO1999US22604 19990929

**Also published as:**

 WO0018799 (A1)  
 US2002002269 (A1)  
 US6284540 (B1)  
 NZ509490 (A)  
 MXPA01003244 (A)

more >>

Abstract not available for JP 2002534957 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 0018799 (A1)**

A novel growth factor, artemin, which belongs to the GDNF/neurturin/persephin family of growth factors, is disclosed. The human and mouse amino sequences have been identified. Human and mouse artemin genomic DNA sequences have been cloned and sequenced and the respective cDNA sequences identified. In addition, methods for treating degenerative conditions using artemin, methods for detecting artemin gene alterations and methods for detecting and monitoring patient levels of artemin are provided.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-534957

(P2002-534957A)

(43) 公表日 平成14年10月22日 (2002.10.22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テレポート (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 1/00	4 B 0 6 3
48/00		9/10	4 B 0 6 5
A 6 1 P 1/00		19/00	4 C 0 8 4
9/10		21/00	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全117頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2000-572257(P2000-572257)	(71) 出願人	ワシントン ユニヴァーシティ アメリカ合衆国、ミズーリ州 63130、セント・ルイス、ワン・ブルッキングス・ドライブ (番地なし)
(86) (22) 出願日	平成11年9月29日 (1999.9.29)	(72) 発明者	ミルブランド、ジェフリー ディー アメリカ合衆国 ミズーリ州 63105 セント・ルイス アパディーン・プレイス 75
(85) 翻訳文提出日	平成13年2月16日 (2001.2.16)	(72) 発明者	バロー、ロバート エイチ アメリカ合衆国 ミズーリ州 63119 セント・ルイス タクシード・ブルヴァード 964
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 9 / 2 2 6 0 4	(74) 代理人	弁理士 伊東 忠彦
(87) 国際公開番号	W O 0 0 / 1 8 7 9 9		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成12年4月6日 (2000.4.6)		
(31) 優先権主張番号	0 9 / 1 6 3 , 2 8 3		
(32) 優先日	平成10年9月29日 (1998.9.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	6 0 / 1 0 8 , 1 4 8		
(32) 優先日	平成10年11月12日 (1998.11.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 新規神経栄養因子であるアルテミン

## (57) 【要約】

成長因子の G D N F / ニューロトロフィン / ベルセフィンファミリーに属する新規な成長因子である、アルテミンを開示する。ヒト及びマウスのアミノ酸配列が同定された。ヒト及びマウスのアルテミンゲノム DNA 配列は、クローニングされ、配列決定され、夫々の c D N A 配列が同定された。また、アルテミンを使用して変性症状の治療方法、アルテミン遺伝子改変の検出方法、患者のアルテミンレベルの検出及び監視方法を開示する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 アルテミンアミノ酸配列又はその保存的置換変異体又は少なくとも8つの隣接したアミノ酸のその断片を含む、単離及び精製された成長因子。

【請求項2】 三叉神経節ニューロンの、結節性神経節ニューロンの、上いし神経節ニューロンの、チロシン-ヒドロキシラーゼ発現ドーパミン作動性腹側中脳ニューロンの生存を促進させる、請求項1に記載の単離及び精製された成長因子。

【請求項3】 配列番号(SEQ ID NO)19と、配列番号(SEQ ID NO)33と、それらの保存的置換変異体と少なくとも75%同一である哺乳類配列を含む、請求項1に記載の単離及び精製された成長因子。

【請求項4】 配列番号(SEQ ID NO)3、配列番号(SEQ ID NO)4、配列番号(SEQ ID NO)5で記述されるヒトポリペプチド配列を含む、請求項3に記載の単離及び精製された成長因子。

【請求項5】 配列番号(SEQ ID NO)40で記述されるヒトブローアルテミンと、又は配列番号(SEQ ID NO)26若しくは配列番号(SEQ ID NO)32で記述されるヒトブレブローアルテミンと、又はそれらの保存的置換変異体と、又は非アルテミンブレブロー領域とヒトポリペプチド配列とを含むポリペプチドと、を含む請求項4に記載の単離及び精製された成長因子。

【請求項6】 配列番号(SEQ ID NO)34、配列番号(SEQ ID NO)35、配列番号(SEQ ID NO)36で記述されたマウスポリペプチド配列と、又はそれらの保存的置換変異体とを含む請求項3に記載の単離及び精製された成長因子。

【請求項7】 配列番号(SEQ ID NO)41で記述されるマウスブローアルテミンと、又は配列番号(SEQ ID NO)27で記述されるマウスブレブローアルテミンと、又はそれらの保存的置換変異体と、又は非アルテミンブレブロー領域とマウスポリペプチドとを含むポリペプチドと、を含む請求項6に記載の単離及び精製された成長因子。

【請求項8】 1998年12月22日に、ATCCに寄託したDNAに含有されるヒトcDNAによりコードされたアルテミンポリペプチドと同一なアミ

ノ酸配列を含む、請求項1に記載の単離及び精製された成長因子。

【請求項9】 (a) 発現調節要素と操作可能に結合した、1998年12月22日にATCCに寄託したヒトアルテミンcDNAクローンにより宿主細胞を形質転換させる形質転換工程と、

(b) 前記クローンによりコードされたアルテミンポリペプチドを発現させる発現工程と、

を具備する方法により産出させたアルテミンポリペプチドを含む、請求項1に記載の単離及び精製された成長因子。

【請求項10】 (a) 配列番号(SEQ ID NO)48で記述されるヒトアルテミンのプレー領域若しくは配列番号(SEQ ID NO)49で記述されるマウスアルテミンのプレー領域と、

(b) 配列番号(SEQ ID NO)50で記述されるヒトアルテミンのプロロー領域若しくは配列番号(SEQ ID NO)51で記述されるマウスアルテミンのプロロー領域と、

(c) 配列番号(SEQ ID NO)52で記述されるヒトアルテミンのプロロー領域若しくは配列番号(SEQ ID NO)53で記述されるマウスアルテミンのプロロー領域と、

(d) (a)、(b)又は(c)の保存的置換変異体と、  
を含む単離及び精製された成長因子。

【請求項11】 請求項1に記載のアルテミンポリペプチド断片と、TGF- $\beta$ スーパーファミリーからの少なくとも一つの他の成長因子の断片と、  
を含むパン成長因子。

【請求項12】 請求項11に記載の前記パン成長因子をコードするポリヌクレオチドを含む核酸。

【請求項13】 請求項1に記載の成長因子と、GFR $\alpha$ ポリペプチドと、  
を含む組成物。

【請求項14】 前記GFR $\alpha$ ポリペプチドはGFR $\alpha$ 3ポリペプチドまたはGFR $\alpha$ 1ポリペプチドである、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】 請求項1に記載の成長因子をコードするヌクレオチド配列



と、又は少なくとも15の隣接したヌクレオチドからなる前記ヌクレオチド配列の断片とを含む、単離及び精製させた核酸分子又はその分子に相補的な核酸分子。

【請求項16】 三叉神経節ニューロンの、結節性神経節ニューロンの、上けい神経節ニューロンの、チロシン-ヒドロキシラーゼ発現ドーパミン作動性腹側中脳ニューロンの生存を促進させるアルテミンポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項15に記載の単離及び精製させた核酸分子又はその分子に相補的な核酸分子であって、前記核酸分子は、配列番号(SEQ ID NO)6、配列番号(SEQ ID NO)7又は配列番号(SEQ ID NO)8で記述される成熟ヒトアルテミンヌクレオチド配列と、又は配列番号(SEQ ID NO)37、配列番号(SEQ ID NO)38又は配列番号(SEQ ID NO)39で記述される成熟マウスアルテミンヌクレオチド配列と、特にハイブリダイズする、単離及び精製させた核酸分子又はその分子に相補的な核酸分子。

【請求項17】 配列番号(SEQ ID NO)3、配列番号(SEQ ID NO)4、配列番号(SEQ ID NO)5、配列番号(SEQ ID NO)34、配列番号(SEQ ID NO)35又は配列番号(SEQ ID NO)36で記述されるアルテミンポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項16に記載の単離及び精製させた核酸分子又はその分子に相補的な核酸分子。

【請求項18】 配列番号(SEQ ID NO)6、配列番号(SEQ ID NO)7、配列番号(SEQ ID NO)8、配列番号(SEQ ID NO)37、配列番号(SEQ ID NO)38、配列番号(SEQ ID NO)39又は配列番号(SEQ ID NO)44で記述されるヌクレオチド配列を含む、請求項17に記載の単離及び精製させた核酸分子又はその分子に相補的な核酸分子。

【請求項19】 請求項15に記載の核酸分子と操作可能に結合した発現調節要素を含むベクター。

【請求項20】 請求項19に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項21】 1998年12月22日に行ったATCC寄託物を含む、請求項15に記載の単離及び精製させた核酸分子。

【請求項22】 請求項21に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項23】 配列番号(SEQ ID NO)41で記述されるヒトブローアルテミンと、配列番号(SEQ ID NO)26又は配列番号(SEQ ID NO)32で記述されるヒトブレ-ブローアルテミンと、配列番号(SEQ ID NO)42で記述されるマウスブローアルテミンと、配列番号(SEQ ID NO)29で記述されるマウスブレ-ブローアルテミンと、非アルテミンブレ-ブロー領域配列とヒト若しくはマウス成熟アルテミンアミノ酸配列とを含むポリペプチドと、からなる群から選択されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項15に記載の単離及び精製させた核酸分子。

【請求項24】 配列番号(SEQ ID NO)42で記述されるヒトブローアルテミンヌクレオチドと、配列番号(SEQ ID NO)24、配列番号(SEQ ID NO)30又は配列番号(SEQ ID NO)44で記述されるヒトブレ-ブローアルテミンヌクレオチドと、配列番号(SEQ ID NO)43で記述されるマウスブローアルテミンヌクレオチドと、配列番号(SEQ ID NO)27で記述されるマウスブレ-ブローアルテミンヌクレオチドと、を含む、請求項23に記載の単離及び精製させた核酸分子。

【請求項25】 アルテミンヌクレオチド配列又はその相補体を含み、前記アルテミンヌクレオチド配列は、ブレ-ブローアルテミンポリペプチドと、ブローアルテミンポリペプチドと、成熟アルテミンポリペプチドと、上記の保存的置換変異体と、少なくとも8つの隣接したアミノ酸を有する上記の断片と、からなる群から選択されたアミノ酸配列をコードする、組換え核酸分子。

【請求項26】 アルテミンアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項15に記載の単離及び精製させた核酸分子。

【請求項27】 (a) 配列番号(SEQ ID NO)54若しくは配列番号(SEQ ID NO)55で記述されるアルテミンのブレ-領域と、

(b) 配列番号(SEQ ID NO)56若しくは配列番号(SEQ ID NO)57で記述されるアルテミンのブロー領域と、

(c) 配列番号(SEQ ID NO)58若しくは配列番号(SEQ ID NO)59で記述されるアルテミンのブレ-ブロー領域と、

(d) (a)、(b)又は(c)の保存的置換変異体と、  
を含む単離及び精製された核酸分子。

【請求項28】 アルテミンポリペプチド又は請求項1に記載の断片と特に  
反応する単離及び精製された抗体。

【請求項29】 請求項28に記載の抗体とサンプルとを接触させる接触工  
程と、アルテミンポリペプチドへの前記抗体の結合を検出する検出工程と、を具  
備するサンプル中のアルテミンポリペプチドの発現の検出方法。

【請求項30】 配列番号(SEQ ID NO)9からなるポリヌクレオチドと特に  
ハイブリダイズする、サンプル中のポリヌクレオチドを検出する検出工程を具備  
する、サンプル中のアルテミンmRNA発現の検出方法。

【請求項31】 ポリヌクレオチドの前記検出工程は、

(a) 配列番号(SEQ ID NO)6からなるポリヌクレオチドと特にハイブリ  
ダイズするポリヌクレオチドで、サンプル中のmRNAを接触させる接触工程と、

(b) 前記ポリヌクレオチドと前記アルテミンmRNAとの間のハイブリ  
ダイゼーション複合体の存否を検出する検出工程とを具備する、請求項30に記載  
の検出方法。

【請求項32】 前記検出工程は、

(a) 逆転写法を利用してアルテミンmRNAからのcDNAを産出させ、

(b) 被増幅cDNAの領域を形成させるために、前記cDNAと特にハイ  
ブリダイズする少なくとも二つのオリゴヌクレオチドで前記cDNAを接触させ

、

(c) 前記cDNA領域を増幅させ、

(d) 増幅させたcDNA領域を検出する

ことを含む請求項30に記載の検出方法。

【請求項33】 アルテミンポリペプチド又はその断片の有効量で細胞を処  
置する処置工程を含む、細胞に栄養を供給する及び/又は細胞分化を生じさせる  
方法。

【請求項34】 前記処置工程は、GFR $\alpha$ 3ポリペプチドのあるなしで、  
アルテミンポリペプチド又は断片を細胞に投与することを含む、請求項33に記

載の方法。

【請求項35】 ターゲット細胞は患者体内にあり、前記処置工程は、GF R $\alpha$ 3ポリペプチドのあるなしで、アルテミンポリペプチド又は断片を患者に投与することを含む、請求項33に記載の方法。

【請求項36】 ターゲット細胞は患者体内にあり、前記処置工程は、アルテミンポリペプチド又は断片をコードするポリヌクレオチドを患者に投与することを含む、請求項33に記載の方法。

【請求項37】 前記アルテミンポリペプチドは患者へ移植した細胞により発現される、請求項33に記載の方法。

【請求項38】 前記ターゲット細胞は、抹消神経疾患、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、虚血発作、急性脳損傷、脊髄索損傷、ニューロblastomaのような神経系癌、多発硬化、特発性便秘のような感染若しくは腸の病気、パーキンソン病、脊髄索損傷又は麻酔鎮痛剤の使用と関連した便秘を患っている患者のニューロンである、あるいは前記ターゲット細胞は小細胞肺カルチノーマを患っている患者の非ニューロン細胞である、請求項30に記載方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

政府助成金への言及

本発明は、NIH助成金番号第5RO1-AG13730-03により政府支援によりなされた。政府は本発明にある権利を有する。

## 【0002】

関連出願

1998年11月12日に出願された仮出願番号第60/108,148号の優先権を主張する本願は、1998年9月29日に出願された出願番号第09/163,283号の一部継続出願である。

## 【0003】

発明の背景

## (1) 発明の属する分野

本発明は、栄養因子又は成長因子に係り、より詳細には、成長因子のニューロツリン(neurturin) - GDNFファミリーのメンバーである新規成長因子、アルテミン(artemin)に関する。

## (2) 関連技術の説明

複合有機体における組織の発生及び維持には細胞の増殖、分化、生存及び機能の過程を精密に制御することを必要とする。これらの過程を制御する主要なメカニズムは、「成長因子」として公知であるポリペプチドの作用を介して行われる。これらの構造的に多様な分子は、特定の細胞表面レセプタを介してかかる作用をもたらすように機能する。

## 【0004】

「神経栄養因子」と称される成長因子はニューロンの分化、成長及び生存を促進し、成熟表現型を維持し、栄養サポートをもたらす。神経栄養因子は神経系又は神経刺激組織に存在する。神経成長因子(NGF)は、まず認識され特徴付けられる神経栄養因子である(Levi-Montalcini他, J.Exp.Zool. 116:321, 1951)。NGFは交感神経ニューロン、神経堤由来感覚ニューロン及び基底前脳コリン性ニューロンの生存及び成長を促進する非共有結合ホモダイマーとして存在する

。交感神経ニューロンの中で、この物質はインビトロでニューライト (neurite) の発芽後成長を生じさせ、インビボでは増加された軸索及び樹状突起の成長を生じさせる (Levi-Montalcini 及び Booker, Proc Nat'l Acad Sci 46; 1960:384-391; Johnson 他, Science 210:916-918, 1980; Crowley 他, Cell 76:1001-12, 1994 を参照のこと)。NGF は認知作用及びニューロンの可塑性に影響を与え、物理的、化学的、ウイルス性及び免疫性といった多様な害によって損傷を受けるニューロンの生存を促進しうる (Snider 及び Johnson, Ann Neurol 26:489-506, 1989; Hefti, J Neurobiol 25:1418-1418)。また、NGF は内分泌系に対して、及び免疫及び炎症の過程において広く相互作用することが知られている (Sully and Otten, Cell Biol Int 19:459-469, 1995; Otten and Gadiant, Int. J. Devl Neurosci 13:147-151, 1995 に概観されている)。例えば、NGF はマスト細胞の生存を促進する (Horigome ほか, J Biol Chem 269:2695-2707, 1994)。

#### 【0005】

近年、成長因子はそれらのアミノ酸配列の類似性に基づいていくつかのクラス、即ち、ファミリー又はスーパーファミリーに分類されることが明らかとなった。これらのファミリーは、例えば繊維芽成長因子ファミリー、ニューロトロフィン (neurotrophin) ファミリー及びトランスフォーミング成長因子ベータ (TGF- $\beta$ ) ファミリーである。ファミリーメンバー配列の類似性の一例として、TGF- $\beta$  ファミリーのメンバーはこのスーパーファミリーのメンバーを同定する7つのカノニカルフレームワーク (canonical framework) システイン残基を有する。

#### 【0006】

NGF はかかる成長因子のファミリーのプロトタイプである。このファミリーの2番目に発見されたメンバーである脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、NGF モノマーの3種の内部ジスルフィドを形成する6種のシステイン全ての保存によりNGFに関連づけられることが示された (Barde, Prog Growth Factor Res 2:237-248, 1990 及び Liebrock 他, Nature 341:149-152, 1989 参照)。2つの因子の保存度の良い部分のBDNFによって提供される情報を利用することにより、

このニューロトロフィンファミリーの更なるメンバー (NT-3、NT-4/5) は幾つかのグループによって迅速に見出された (Klein, FASEB J 8:738-44, 1994)。

### 【0007】

最近、NGF及び他のニューロトロフィンに構造的に関連しない神経栄養因子の新しいファミリーが同定されたが、TGF- $\beta$ と構造的には類似している。米国特許第5,739,307号と係属出願の出願番号08/931,858号にて開示されているように、TGF- $\beta$ スーパーファミリーのサブファミリーの公知なメンバーには、グリア細胞系統由来神経栄養因子 (GDNF) と、ニューロツリン (NTN) とペルセフィン (PSP) がある。GDNFリガンドファミリーと称される、GDNF、ニューツリン及びペルセフィンの同じ成長因子ファミリーへの位置は、それらの物理的構造及び生物学的活動の類似性を基調とする。ヒトペルセフィンは、ヒトGDNFと約40%の配列同一性と約43%の配列保存性を有し、ヒトニューロツリンと約49%の配列同一性と約50%の配列保存性を有する。同様に、ヒトニューロツリンは、ヒトGDNFと約43%の配列同一性と約53%の配列保存性を有する。加えて、上記三つのタンパク質は、位置が正確に保存された7つのシステイン残基を有する。GDNF、ニューロツリンとペルセフィンは、それぞれ、ドーパミン作動性中脳ニューロンと、脊髄及び顔面モータニューロンを、インビトロ生存及びインビボ損傷パラダイムにて、生存を支援し、神経変性病の治療に対する潜在的治療剤として、上記リガンドを同定する (Henderson他、Science 266, 1062-1064, 1994; Horger他、J. Neurosci. 18, 4929-37 1998; Lin他、Science 260, 1130-1132, 1993; Mibrandt他、Neuron 20, 245-53, 1998; Oppenheim他、Nature 373, 344-346, 1995; GrondinとGash、J. Neurol. 245 (11 Suppl 3), 35-42, 1998に概観されている)。しかしながら、GDNF及びニューロツリンの双方は、培養中の、交換神経ニューロン、副交感神経ニューロン、感覚ニューロン及び腸神経を含む、多くの抹消ニューロンを支援し (Buj-Bello他、Neuron 15, 821-828, 1995; Ebendal他、J. Neurosci Res 40, 276-284, 1995; Heucheroth他、Dev. Biol. 200, 116-29, 1998; Kotzbauer他、Nature 384, 467-470, 1996; Trupp他、J of Cell Biology

130, 137 - 148, 1995)、ペルセフィンは抹消ニューロンにて上記の活動を共有しない(Milbrandt他、前掲)。

### 【0008】

GDNFとニューロツリンはレセプタとシグナル導入経路を共有する(Creedon他、Proc. Natl. Acad. Sci. US 94: 7018 - 7023, 1997; Curbec他、nature 381: 789 - 793, 1996; Trupp他、Nature 381: 785 - 789, 1996; Baloh他、Neuron 他、18: 793 - 802, 1997)。上記のタンパク質は多成分レセプタを介して作用し、貫膜シグナル導入成分であるRetタンパク質 - チロシンキナーゼ(RetまたはRet PTK)は、GDNF/ニューロツリンファミリーの成長因子とGFR $\alpha$ という名の密接に関連したコレセプタファミリーのメンバーと結合すると活性化される。GFR $\alpha$ コレセプタの特徴は、そのメンバーが貫膜ドメインを有さず、グルコシル - ホスファチジルイノシトール(GPI)結合を介して細胞表面に付着していることである(Durbec他、Nature 381: 789 - 793, 1996; Jing他、Cell 85: 1113 - 1124, 1996; Treanor他、nature 382: 80 - 83, 1996; Truppe他、Nature 381: 785 - 789, 1996; Baloh他、1997、前掲)。GFR $\alpha$ ファミリーのメンバーには、GFR $\alpha$ 1(GDNFR $\alpha$ 、Tmr1とRetL1として従前から公知)と、GFR $\alpha$ 2(TrnR2、NTNR $\alpha$ とRetL2として従前から公知)と、GFR $\alpha$ 3(TrnR3として従前から公知)(GFR $\alpha$ 命名法委員会、Neuron 19(3):485, 1997)と、チキンにて現在同定されたレセプタである可能なGFR $\alpha$ 4(cGFR $\alpha$ 4)とがある(Enokido他、Current Biology 8, 1019-1022, 1998)。

### 【0009】

多くのグループによるインビトロ実験からの結果から、GFR $\alpha$ 1/RETはGDNFの好適なレセプタであり、GFR $\alpha$ 2/RETはNTNの好適なレセプタであるが、異なるレセプタ間でクロストークは起こり得ることが示された(Baloh他、1997前掲、Jing他、1996、前掲、Jing他、J. Biol. Chem. 272. 33111 - 33117, 1997; Klein他、Nature 387, 717 - 721, 1997; Sanicola他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 6238 - 6243, 1997; Suvanto他、Hum. Molec. Genet. 6, 1257 - 1273, 1997; Treanor他、1996、前掲)。GFR $\alpha$ 1一欠陥マウスの最近



の解析から、 $GFR\alpha 1$ は腎臓器官形成及び腸神経系発生の生理学的に関連するGDNFレセプタのみである(Cacalano他、Neuron 21, 53-62, 1998; Enomoto他、Neuron 21, 317-324, 1998)。しかしながら、GDNF-欠陥マウスは、 $GFR\alpha 1$ -欠陥マウスよりも抹消神経節にて大きく損傷しており、 $GFR\alpha 2$ / $Ret$ と同様に、GDNFは抹消ニューロンの生存を支えるために、さらなる他のレセプタを利用できることを示唆している(Cacalano他、前掲; Enokido他、前掲)。ペルセフィンは、 $GFR\alpha 1$ / $RET$ 又は $GFR\alpha 2$ / $RET$ レセプタ複合体のいずれをも介してシグナルを送ることはできないが(Milbradt他、前掲)、最近の報告では、ペルセフィンは $cGFR\alpha 4$ に結合し、また $RET$ を介してシグナルを送る傾向があることが示された(Enokido他、前掲)。

#### 【0010】

$GFR\alpha 3$ は、 $GFR\alpha 1$ 及び $GFR\alpha 2$ と相同である発現配列タグ(expressed sequence tag, EST)として最初に同定された(Baloh他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 5801-5806, 1998, 前掲; Jing他、1997前掲; navelihan他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1295-300, 1998; Widenfalk他、Eur. J. Neurosci. 10, 1998; Worby他、J. Biol. Chem 273, 3502-3508, 1998)。しかしながら、形質転換細胞での解析により、 $GFR\alpha 3$ は任意の公知のGDNFファミリーリガンドである、GDNF、ニューロツリン又はペルセフィンに対して $RET$ と機能性レセプタを形成しないことが示された(Baloh他、1998 前掲)。 $GFR\alpha 3$ 発現は $GFR\alpha 1$ 又は $GFR\alpha 2$ よりも一層制限され、抹消神経及び神経節は発生する際に高レベルの発現が観測された(Baloh他、1998、前掲; Naveilhan他、前掲; Widenfalk他、前掲; Worby他、1998)。さらに、ある報告では、三叉神経節の感覚ニューロンでは、 $GFR\alpha 3$ は $GFR\alpha 1$ と $GFR\alpha 2$ とは区別されるニューロンの集団で発現され、 $RET$ と重なる傾向があることが例証された(Naveilhan他、前掲)。構造上の類似性、発現及び機能データとともに、 $GFR\alpha 3$ は $RET$ と相互作用するが、本願の研究結果では、かかる相互作用を初めて例証し、 $GFR\alpha 3$ に対するリガンドを初めて同定したことを報告する。

#### 【0011】

現在、概して神経栄養因子は、胎児の生存及び発達並びに成人期における構造的な完全性及び可塑性を含むニューロン機能の多くの諸相を調節すると考えられている。慢性神経変性疾患と同様に急性神経系傷害は、構造損傷及び恐らく疾患由来のアポトーシスによって特徴付けられるため、神経栄養因子がこれらの病気において何らかの役割を果たす蓋然性が高い。実際に、かなりの証拠によって、神経栄養因子が、現在人間社会を悩ませている社会的及び経済的に最も有害な疾患であるこれらの神経変性症状の処置に有効な治療物質でありうる蓋然性が示唆されている。それでもなお、多様な神経栄養因子は優先的に異なるレセプターを介し、各種のニューロン又は非ニューロン細胞タイプに対して潜在的に作用するため、神経系の各種急性及び慢性疾患の診断及び治療に使用される神経栄養因子ファミリーの新しいメンバーを同定することが引き続き必要とされている。

#### 【0012】

##### 発明の要約

よって、簡潔に述べると、本発明は新規成長因子であるアルテミンに係り、該アルテミンは細胞の生存及び成長を促進させる。GDNF及びニューロトロフィンと同様に、アルテミンは数多の抹消ニューロン集団の生存を支援し、また、腹側中脳のドーパミン作動性ニューロンをも支援する。しかしながら、アルテミンはGFR $\alpha$ と結合し、GFR $\alpha$ 3/RETレセプタ複合体を活性化させるGDNFファミリーのメンバーであり、その他に、GDNF及びニューロトロフィンと同様に、アルテミンはGFR $\alpha$ 1/RETと結合して活性化をもさせる。GFR $\alpha$ 3は、1998年12月22日に本願と同時に出版した発明名称「GFR $\alpha$ 、GDNFコレセプタファミリーの新規メンバー」である特許出願に開示されており、このGFR $\alpha$ 3の出願は参考としてその全体は本願に援用される。

#### 【0013】

したがって、本発明はアルテミンポリペプチドとポリヌクレオチドを提供する。本発明の範囲内のアルテミンポリペプチドには、任意の天然アルテミンポリペプチド、その保存的置換変異体若しくはその断片がある。アルテミンポリペプチドは培養中の抹消及び中枢ニューロンの生存を、好ましくは三叉神経節ニューロンの、結節性神経節ニューロンの、上けい神経節ニューロンの、チロシンヒド

ロキシラーゼ発現ドーパミン作動性腹側中脳ニューロンの生存を、より好ましくは上記のニューロンの任意の組合せの生存、さらに好ましくは上記ニューロンの全ての生存を促進させる。

#### 【0014】

好適なアルテミンポリペプチドには、予想されたヒト成熟ポリペプチド（配列番号(SEQ ID NO) 3から5、図3A、図3B及び図3Cを参照）と、予想されたマウス成熟ポリペプチド（配列番号(SEQ ID NO) 34から36）とがある。上記の成熟ポリペプチドは、本発明の範囲内でもあるヒト又はマウスプレ-プロアルテミン（それぞれ、配列番号(SEQ ID NO) 26と29）、或いはヒト又はマウスプロ-アルテミン（それぞれ、配列番号(SEQ ID NO) 40と41）を、RXXR開裂部位の一つで（図1A、図1B、図1C及び図2Bを参照のこと）、開裂させることにより生じうる。加えて、成熟アルテミンは、成熟アルテミンのN-末端非アルテミンプレ-プロ-領域を含有するポリペプチドを開裂させることにより生じ得る。また、アルテミンポリペプチドは、ヒト又はマウス成熟アルテミン（それぞれ、配列番号(SEQ ID NO) 19と33）の第一のカノニカルシステインから第7番目のカノニカルシステインの断片を含む。

#### 【0015】

アルテミンはさまざまな哺乳類からの相同配列間の少なくとも75%の配列同一性を示すと考えられ、よって、成熟アルテミンの哺乳類オルソログ（ortholog）は、成熟ヒトアルテミン（配列番号(SEQ ID NO) 3から5）と成熟マウスアルテミン（配列番号(SEQ ID NO) 34から36）と少なくとも75%の配列同一性を有すると考えられる。配列相同性は、鳥類種のような非哺乳類種では、最低でも65%である。

#### 【0016】

ヒトアルテミンポリペプチドは、1998年12月22日にATCCに寄託したクローンに含有されるcDNAによりコードされる。よって、ヒトアルテミンポリペプチドは発現調節要素と操作可能に結合した本クローンのcDNAで宿主細胞を形質転換させることにより産出される。次いで、細胞はコードされたヒトアルテミンポリペプチドを発現するように、条件を設定する。かかるヒトアルテ

ミンポリペプチドは本発明の範囲内に内包される。

#### 【0017】

また、本発明は、アルテミンポリペプチドと、栄養サポートを提供するように、及び／又はインビボ若しくは半ビボの細胞又は患者の細胞の分化を生じさせるように、細胞に投与するのに適する薬学的に許容な担体と、を含む組成物を提供する。アルテミンの成長促進効果を容易にするために、GFR $\alpha$ コレセプタはアルテミンとともに投与され得る。よって、別の実施態様では、本発明はアルテミンポリペプチドと、GFR $\alpha$ 3又はGFR $\alpha$ 1のようなGFR $\alpha$ ポリペプチドと、を含む組成物を提供する。

#### 【0018】

別の実施態様では、本発明はパン(pan) - 成長因子と、そのパン - 成長因子をコードするポリヌクレオチドとを含む。そのパン - 成長因子は、一部のアルテミンポリペプチドと、TGF- $\beta$ スーパーファミリーからの少なくとも一つのパン - 成長因子とを含む。好ましくは、他の成長因子はニューロツリン、ベルセフィン又はGDNFである。

#### 【0019】

また、別の実施態様における本発明は、アルテミンヌクレオチド配列を含む単離及び精製された、及び／又は組換え核酸分子を提供する。アルテミンヌクレオチド配列はアルテミンポリペプチド、その保存的置換変異体及びそれらの断片をコードする。また、本発明の範囲内には、少なくとも15の隣接するヌクレオチドのアルテミンヌクレオチド配列の断片も包含される。アルテミン核酸分子は、成熟ヒトアルテミンヌクレオチド配列(配列番号(SEQ ID NO)6から8)と若しくはそれらの相補体(配列番号(SEQ ID NO)9から11)と、或いは成熟マウスアルテミンヌクレオチド配列(配列番号(SEQ ID NO)37から39)と若しくはそれらの相補体(配列番号(SEQ ID NO)60から62)と、特にハイブリダイズする。

#### 【0020】

本発明の好適なポリヌクレオチドは、成熟アルテミンポリペプチド(配列番号(SEQ ID NO)3から5)、特に、図3A、図3B及び図3Cに記載された配列番

号(SEQ ID NO) 6から8のポリヌクレオチド配列をコードするヒトポリヌクレオチドを、或いは成熟マウスアルテミンポリヌクレオチド(配列番号(SEQ ID NO) 34から36)、特に、配列番号(SEQ ID NO) 37から39のポリヌクレオチドをコードする対応するマウスポリヌクレオチドを、含む。また、プロ-アルテミンポリペプチド(それぞれ、配列番号(SEQ ID NO) 40と41)、特に、それぞれ、配列番号(SEQ ID NO) 42と43のポリヌクレオチド配列をコードするヒト及びマウスプロ-アルテミンポリヌクレオチドと、並びにプレ-プロ-アルテミンポリヌクレオチド(それぞれ、配列番号(SEQ ID NO) 26と29)、特に、配列番号(SEQ ID NO) 24、配列番号(SEQ ID NO) 30又は配列番号(SEQ ID NO) 46のヒトポリヌクレオチド配列と配列番号(SEQ ID NO) 27のマウスポリヌクレオチド配列とをコードするマウスプレ-プロ-アルテミンポリヌクレオチドをも、包含する。加えて、ポリヌクレオチドはN-末端非アルテミンプレ-プロ-領域と成熟アルテミンとを含有するポリペプチドをコードし、発現系及びN-末端非アルテミンプレ-プロ-領域の開裂でのポリペプチドの発現の際に、成熟アルテミンが産出される。また、アルテミンポリヌクレオチドは、第1番目のカノニカルシステインから第7番目のカノニカルシステイン(配列番号(SEQ ID NO) 19と33)のポリペプチドをコードするアルテミンポリヌクレオチド配列の部分を含む。

#### 【0021】

ヒト若しくはマウスアルテミンポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができる配列は、アルテミン遺伝子及びその転写産出物の検出方法、並びに他の哺乳類及び非哺乳類種からアルテミンをコードするポリヌクレオチドを単離させる際に利用し得る。また、かかる方法は、本発明の範囲に包摂される。

#### 【0022】

また、本発明はアルテミン若しくはその断片と特に反応する抗体と、その抗体と結合することによりサンプル中のアルテミンポリペプチドの検出方法と、を提供する。

#### 【0023】

別の実施態様では、さらに、本発明は栄養支援を提供する方法、及び/又は有

効量のアルテミンポリペプチドで細胞を処置することを含むターゲット細胞の分化を生じさせる方法を提供する。ターゲット細胞の変性若しくは正常な機能の損失を引き起こす医療状態に悩まされている患者において、そのターゲット細胞にインビトロ、半ビボ又はインビボでアルテミンを与え得る。一的好適な実施態様では、細胞は、アルテミンポリペプチド若しくは発現のためにアルテミンポリペプチドをコードするアルテミンポリヌクレオチドを患者に投与することにより、インビボで処置される。患者は、抹消神経疾患、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、虚血発作、急性脳損傷、脊髄索損傷、ニューロブラストーマのような神経系癌、多発硬化、特発性便秘のような感染、小細胞肺カルチノーマ若しくは腸の病気、パーキンソン病、脊髄索損傷又は麻酔鎮痛剤の使用と関連した便秘を患っている。

#### 【0024】

本発明によって達成される幾多の利点のうち、特に注意すべき利点は、新規な成長因子であるアルテミン、特に、萎縮、特定の細胞の変性又は死を防止する。より詳細には、栄養サポートの必要なニューロンのためのヒトアルテミンの提供；遺伝子治療に利用されるアルテミンをコードするポリヌクレオチドの提供；組換え技術によりアルテミンの入手方法の提供；ターゲット細胞、特にニューロンに栄養支援法の提供；細胞変性、特にニューロン変性に関係する症状の治療方法の提供；患者内のアルテミンレベルの検出及び監視方法の提供；アルテミン遺伝子の改変の検出方法の提供；である。

#### 【0025】

##### 好適な実施例の説明

本発明は、アルテミンとして本願で同定されたニュールツリン／ベルセフィン／GDNFリガンドファミリーの新しいメンバーをコードするゲノム及びcDNAクローンの同定、単離及び配列決定に基づく。アルテミンの発見は、参考としてその全体が援用される係属中の米国出願第08/775,414号に記載されたニュールツリンと、参考としてその全体が援用される係属中の米国特許出願第08/981,739と同第08/931,858号に記載されたベルセフィンの発見に続く。

## 【0026】

アルテミンは、感覚ニューロン、神経冠、脊椎動物由来の感覚ニューロン及びドーパミン作動性中脳ニューロンを含む、インビトロの幾多の抹消及び中枢神経集団の生存を促進させる。アルテミンは、インビトロのGFR $\alpha$ 3/RETとGFR $\alpha$ 1RETレセプタ複合体の双方を活性化させるが、GFR $\alpha$ 3/RETはインビボのアルテミンシグナル送信用の好適な多成分レセプタであると考えられる。

## 【0027】

以下に詳細に説明するように、アルテミンは、ハイスループットゲノム配列(hgts)データベースをスキャンさせて、ネズミブレ-プロ-ニューロツリンアミノ酸配列を利用して発見された。この研究では二つのhgts配列を識別し(AC005038とAC005051)、DNAがコードするブレ-プロニューロツリンと相同であるDNAの領域を有する。ただし、その後、そのhgtsは多くの配列誤差、つまり、省略、付加および不正確な塩基を有することが発見され、hgts配列の一方は(AC005038)、197のヌクレオチドのストレッチを有し(ヌクレオチド67、464から67、660)、最終的には、アルテミン核酸(図1B)の相補的鎖のヌクレオチド663から467と同一であることが判明し、他方は(AC005051)、アルテミン核酸(図1B)の相補的鎖のヌクレオチド648から468と同一である183のヌクレオチド(ヌクレオチド113、379から113、561)のストレッチを有していた。

## 【0028】

新規な成長因子のコーディング領域に対応するhgts配列であるか否かを決定するために、ヒトゲノムDNAからの疑わしいコーディング領域の重複ポリヌクレオチドを増幅させるhgts配列に基づき、オリゴヌクレオチドプライマーを設計した。重なるポリヌクレオチドが配列決定され、この配列情報をhgts配列と組合せて、図1Aに示す相補的ゲノムヌクレオチド配列(配列番号(SEQ ID NO): 1から2)を組立てた。配列番号(SEQ ID NO): 1のリーディングフレームの一つは部分的プロ-アルテミンアミノ酸配列をコードし、潜在的RXXEタンパク質分解処理部位(図1Aのボックス)を含むプロ-ドメイン内から延長

し、図1Aの最終ラインに示す第二のグリシン残基で終端する。他のGDNFリガンド(図2A)のある予想された成熟ヒトアルテミン(hART)タンパク質のアラインメントは、アルテミンがGDNFリガンドファミリーの新規なメンバーを表わすことを確認し、アルテミンはニューロツリン及びベルセフィンと殆ど類似であり(約45%の同一性)、GDNFと僅かに異なる(約36%の同一性)。ヒトアルテミンゲノム配列から設計されたプライマーは、マウスアルテミン遺伝子を含有するクローンを同定するために利用した。

### 【0029】

アルテミンをコードする全長mRNA種を単離するために、ヒト及びマウスアルテミンゲノム配列に対応するプライマーは、多くのヒト及びマウス組織cDNAライブラリーのcDNA末端(RACE)PCRの迅速な増幅を行うために利用した。ヒト及びマウスからの全長cDNAの解析により(図1B及び図1C)、分泌用の単一のペプチドを有する全長ヒト及びマウスアルテミンタンパク質の予測が可能となり(図2Bのアミノ酸1から39)、大きなプロ-領域が成熟領域から多くの保存的RXXRフリンプロテアーゼ開裂部位により分離された(図2B)。ヒトmRNA配列とゲノム遺伝子座との対比から、アルテミンコーディング領域(図2B及び図2C)には二つのイントロンが存在し、その第二番目は他のGDNFファミリーリガンドのプロ-ドメインにて見出されたイントロンと類似の位置に存在する。

### 【0030】

本願でいう成熟アルテミンとは、本願で特徴付けられ説明される成熟ヒト及びマウスアルテミンと実質的に相同であり、かつ生物学的に等価である任意のオリジンの成長因子を包含するように解釈されることを意図している。かかる実質的に相同である成長因子は任意の組織又は種に固有であり、同等に、生物学的活性は多くの生物学的アッセイシステムにより特徴付けられ得る。プレ-プロ-アルテミンとは、プレ-若しくはリーダ又はシグナル配列領域、プロ-配列領域と、本願で定義された成熟アミノ酸配列を含有するプレ-プロ成長因子を含有するように解釈されることを意図している。プロ-アルテミンとは、シグナル配列領域が欠乏しているが、RXXR開裂配列に終端しているプロ-領域と、成熟アルテ



ミンアミノ酸配列と、の双方を含有するポリペプチドを意味することを意図する。

### 【0031】

用語「生物学的に等価」とは、本発明の組成物が、本願で同定された組換えて産出されたアルテミンと同程度である必要はないが、類似した形式で同様な成長促進性質の幾つかまたは全てを例証することができることを意味する。

### 【0032】

「実質的に相同」の意味は、ヒト、マウス、任意の種からのアルテミンを含むアルテミンオルソログ間での配列同一性の程度が、ヒトアルテミンやヒトニュールツリン又はヒトアルテミンとヒトベルセフィンのようなパラログ (paralog) 間のそれよりも大きく、以前に報告したTGF- $\beta$ スーパーファミリーに対するそれよりも大きいことを意味する (TGF- $\beta$ スーパーファミリーメンバーの相同性の解説は、Kingsley, Gene and Dev. 8: 133-46, 1994を参考するとよい)。

### 【0033】

「配列同一性」または「パーセント同一性」とは、レーザジーンバイオコンピュータリングソフトウェア (DNASTAR, INC、ワイオミング州マディソン) のマルチプル配列アラインメントのクラスタル法 (Higgs他、Cabios 8: 189-191, 1992) を利用して整列させた2つの配列間の同じ残基のパーセント(%)を表すことを意図している。この方法では、マルチプルアラインメントは直進性に実行され、アラインメントグループが大きくなればなるほど、一連のペア方向アラインメントから算出された類似のスコアを利用して組立てられる。最適な配列アラインメントは好適なアラインメントのスコアを見出して得ることができ、そのスコアはアラインメント内の独立した残基間の合計スコアの平均である。これにより、所与の進化間隔にわたって2つの関連タンパク間で起こる所与のアミノ酸変化の確率を表す残基重量表から決定することができる。アラインメントのギャップを開き伸ばすことによるペナルティはスコアに加えられる。本プログラムで使用するデフォルトパラメータは、以下の通りである。多重アラインメントのギャップペナルティ=10; 多重アラインメントのギャップ長ペナルティ=10; ペア方向アラインメントのk-タプル(k-tuple) 値=1; ペア方向アライン

メントのギャップペナルティ=3、ペア方向アラインメントのウインドー値=5；ペア方向アラインメントで保存された対角線=5。アラインメント・プログラムに使用される残基重量表はPAM250である(Dayhoffほか、in Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhoff, Ed., NBRF, Washington, Vol. 5, suppl. 3, p. 345, 1978)。

### 【0034】

二つの配列間の配列同一性の割合を算定するために、整列させた配列の同一のアミノ酸の数を基準とする配列の全体のアミノ酸の数で除算する。本願で利用するように、マウスアルテミンで、非アルテミン成長因子、ヒトニュールツリン、ヒトGDNF又はヒトベルセフィンで同一性を算定する際には、基準配列はヒトアルテミンである。同様に、マウスGDNF、マウスニュールツリン又はマウスベルセフィンで同一性割合を算定する際には、基準配列はマウスアルテミンであり、ラットGDNF、ラットニュールツリン及びラットベルセフィンで同一性割合を算定する際には、基準配列はラットアルテミンである。ヒトニュールツリンと非ヒトニュールツリンと間の、ヒトニュールツリンとそのヒトパラログGDNFとベルセフィンとの間の、同一性割合を算定する際には、基準はヒトニュールツリンである。

### 【0035】

保存割合は、二つの残基が保存的置換を表わす位置の数に(PAM残基ウエイトテーブルの0.3と同等若しくは以上のログ奇数値を有するように定義する)、同一の残基の数を追加し、基準配列のアミノ酸の全数で除算することにより、上記のアラインメントから算出される。

### 【0036】

表1は、成熟アルテミン、成熟ベルセフィン、成熟ニュールツリンと多様な種からの成熟GDNFの比較のための同一性(identity)(I)割合と保存(conservation)(C)割合を示す。成熟ヒトアルテミン(hART)と、成熟マウスアルテミン(mART)との間、成熟ヒトアルテミンと成熟ヒトベルセフィン(hPSF)と、成熟ヒトニュールツリン(hNTN)又は成熟ヒトGDNFとの間で、図2A及び図2Bに示すアラインメントを利用して対比を行い、好適な保存的置換

を前記した。ペルセフィンとニューールツリンとの対比は、基準配列が第一に掲載した配列である、係属中の米国出願第08/931,858号に記載した。

【0037】

【表1】

対比	表1	
	同一性%	保存性%
hART v. mART	88	90
hART v. hPSP	45	48
hART v. hNTN	49	51
hART v. hGDNF	36	40
hPSP v. mPSP	81	81
hPSP v. rPSP	80	81
mPSP v. rPSP	94	96
hPSP v. hNTN	49	50
hPSP v. hGDNF	40	43
hNTN v. mNTN	90	93
hNTN v. rGDNF	44	53
hNTN v. mGDNF	43	52
hNTN v. hGDNF	43	53
mNTN v. rGDNF	42	52
mNTN v. mGDNF	41	51
mNTN v. hGDNF	41	52

ヒトアルテミンとマウスアルテミンとの間の配列同一性は約88%である。表1に示すペルセフィン対比では、ヒトペルセフィンとマウス又はラットペルセフィンとの間の同一性は約80%であり、一方、マウスとラットペルセフィンとの間の同一性の程度は約94%であることを示している。表1のニューールツリン対比では、成熟マウスとヒトニューールツリタンパク質は約90%の配列同一性を有することが分かる。さらに、非ヒト哺乳類種の全てのアルテミン、ペルセフィ

ン及びニュールツリンオルソログは、ヒトアルテミン、ヒトベルセフィンまたはヒトニュールツリンとそれぞれ、少なくとも約75%の配列同一性を同様に有すると思われる。鳥類種のような非哺乳類種からのアルテミン、ベルセフィン又はニュールツリンオルソログでは、ヒトアルテミン、ヒトベルセフィン又はヒトニュールツリンとの相同性の程度は少なくとも約65%の同一性であると考えられる。

#### 【0038】

対比のため、成長因子のGDNFリガンドファミリーのファミリーメンバー間の変異は、表1の示す対比から分かる。例えば、ヒトアルテミンはヒトニュールツリンと約49%の配列同一性を有し、ヒトGDNFと約36%の配列同一性を有する。ヒトベルセフィンはヒトニュールツリンと約49%の配列同一性を有し、ヒトGDNFと約40%の配列同一性を有する。同様に、ヒトニュールツリンはヒトGDNFと約43%の配列同一性を有する。よって、GDNFリガンドファミリーの他のメンバーは、アルテミン、ニュールツリン、ベルセフィン又は同じ種のGDNFの配列の約40%という類似の配列同一性を有し、アルテミン、ニュールツリン、ベルセフィン又は同じ種のGDNFと約30から約60%の配列同一性を有する。

#### 【0039】

表1のデータを基礎として、GDNFリガンドファミリーの一定のメンバーは、ヒトGDNFとヒトニュールツリンが互いに、又はGDNFよりも、それぞれマウスGDNFとマウスニュールツリンと一層密接に関連しているように、他の種のファミリーメンバーのオルソログに存在する配列同一性よりも同じ種の他のファミリーメンバーよりは少ない配列同一性を有すると予想される（米国特許第5,739,307号を参照）。同様に、GDNFリガンドファミリーの任意の一定メンバーは、TGF- $\beta$ スーパーファミリーの何れかの公知のメンバーよりも別のファミリーメンバーと大きな配列同一性を有することが予想される（Kingsley、前掲）。

#### 【0040】

GDNFリガンドファミリーのメンバー間の保存は、図4でも確認され、前記

したクリスタルプログラムを利用して、第一から第七のフレームワークシステム残基のGDNF、ニュールツリン（NTN）、ペルセフィン（PSP）及びアルテミン（ART）のヒト配列のアラインメントを示す。このアラインメントから、アルテミンとペルセフィンは96残基のうち46を共有し（48%）、アルテミンはニュールツリンと96残基のうち48を共有し（50%）、アルテミンとGDNFは96残基のうち36を共有する（38%）という点で、アルテミンは他のファミリーメンバーと密接に関連していることは明白である。

#### 【0041】

非ヒト哺乳類種におけるプレ-プロアルテミンのオルソログは、本願で開示された予想成熟ヒトアルテミン配列の一つと少なくとも約75%の配列同一性を有するアミノ酸配列の成熟部分により同定され、プレ-プロアルテミンの非哺乳類オルソログは成熟ヒトアルテミン配列と少なくとも65%の同一性を有するアミノ酸配列の成熟部分により同定され得る。

#### 【0042】

「実質的に相同」という意味には、ヒトアルテミンに特異抗体との交差反応性により分離することができるアルテミンポリペプチドが含まれる。或いは、ゲノムDNA、mRNA若しくはcDNAを含むヌクレオチド配列をコードする抗体が、図1から図3に示す相補的配列とのハイブリダイゼーションによって分離されるアルテミンポリペプチドが含まれる。変性DNA配列は、ヒトアルテミンをコードし得、上記のことは本発明の範囲に含めることを意図していることが当業者には理解される。

#### 【0043】

また、天然のアルテミンの生物学的活性を保持する、保存的に置換されたアルテミントタンパク質は本発明の範囲内である。保存アミノ酸置換とは、同様な側鎖を有する残基の相互交換のことをいう。相互交換アミノ酸は、それらの側鎖の化学的性質に基づきグループ化される。保存的に置換されたアミノ酸は、それらの側鎖の化学的性質に従って、グループ化される。例えば、アミノ酸のあるグループには、中性で疎水性の側鎖（A、V、L、P、W、F及びM）を有するアミノ酸があり、別のグループには、中性で極性側鎖（G、S、T、Y、C、N及びQ

）を有するアミノ酸があり、別のグループには、塩基性側鎖（K、R及びH）を有するアミノ酸があり、別のグループには酸性側鎖（D及びE）を有するアミノ酸があり、別のグループには、脂肪族側鎖（G、A、V、L及びI）を有するアミノ酸があり、別のグループには、脂肪族水酸基側鎖（S及びT）を有するアミノ酸があり、別のグループにはアミン含有側鎖（N、Q、K、R及びH）を有するアミノ酸があり、別のグループには芳香族側鎖（F、Y及びW）を有するアミノ酸があり、別のグループには、硫黄含有側鎖（C及びM）を有するアミノ酸がある。好適な保存アミノ酸置換基は、R-K；E-D、Y-F、L-M；V-I及びQ-Hがある。

#### 【0044】

本願で利用するように、アルテミンポリペプチドは、一以上のアミノ酸は挿入され、欠失され、異なるアミノ酸又は修飾若しくは異常アミノ酸により交換され、並びに修飾配列を含有するポリペプチドがアルテミンの生物学的活性を保持する限り、一以上のアミノ酸のグリコシレーション若しくはホスホリレーションを含む、本願で開示されたアルテミン配列の修飾を包含する。挿入又は欠失アミノ酸が、N-末端、C-末端或いは天然のアミノ酸配列へ付加され又は除去され得る。生物学的活性を保持するとは、修飾ポリペプチドが、細胞により発現されたGFR $\alpha$ 1/RET及び/又はGFR $\alpha$ 3/RETへ結合し、活性化させることを意味する。ただし、本願で同定された成熟ヒトアルテミンポリペプチドと同じレベルの効力であることは必ずしも必要ではない。かかる活性化を試験するアッセイは当業者には公知であり、以下の例7に説明するGal4-E1k/Gal4-Lucレポーターシステムを含む。用語「栄養サポートまたは栄養支援」とは、アルテミンのような成長因子が細胞に栄養を与え、その細胞が少なくとも正常な機能を維持若しくは回復することを意味するために、本願では利用する。

#### 【0045】

また、用語「アルテミンポリペプチド」とは、本願で開示するヒトアルテミン配列の天然の対立遺伝子変種を包含することを意図している。例えば、第二の出発メチオニンをコードするcDNAは、あるヒトcDNAライブラリーからのPACE PCRにより同定され、図1Dに示すプレ-プロアルテミンをコード

する(配列番号(SEQ ID NO):32)。しかしながら、この変種から産出した成熟アルテミンは、図3Aに示す成熟アルテミンと同一であった(配列番号(SEQ ID NO):3)。

#### 【0046】

また、アルテミンの断片は本発明に包摂される。かかる断片は任意の長さであるが、アルテミンの生物学的活性を保持すること、又は抗原性であることが好ましい。かかる生物学的活性若しくは抗原性断片の最小の長さは、公知な技法を利用して当業者には容易に求めることができる。アルテミン断片の最小の長さは、少なくとも8つのアミノ酸、好ましくは少なくとも10のアミノ酸、より好ましくは少なくとも12のアミノ酸、さらに好ましくは少なくとも15のアミノ酸、さらにより好ましくは少なくとも20以上のアミノ酸である。アルテミンの生存活性を保持すると考えられるアルテミンの一の断片は、第一の保存システイン残基で開始し、第七の保存システイン残基で終端する(図4の配列番号(SEQ ID NO):19(ヒト)又は配列番号(SEQ ID NO):33(マウス))。抗原性断片は、宿主動物に投与された際にアルテミン特異抗体を惹起することが可能である、免疫原性であるべき担体分子への共役結合を必要とするより小さな断片を含む。典型的には、抗原性断片は長さが少なくとも5又は6のアミノ酸であり、成熟アルテミンの長さまでであり、好ましくは抗原性断片の長さは8、より好ましくは10、さらに好ましくは12のアミノ酸であり、さらにより好ましくは15のアミノ酸の長さであり、最も好ましくは長さが20以上のアミノ酸である。

#### 【0047】

さらに、アルテミンの特定の個別断片、又はその類似体はアゴニストとしての役目を果たし、断片がGFR $\alpha$ 3/RET又はGFR $\alpha$ 1/RETのようなアルテミンレセプタを活性化させると、ターゲット細胞に生存若しくは成長促進作用を惹起し、或いは他のアルテミン断片若しくはその類似体はアルテミンに対してアンタゴニストとしての働きをし、その断片等がレセプタに結合するが、活性化させない、生存及び成長を促進させない。また、アゴニストであるかかる断片若しくは類似体、並びにアンタゴニストである断片若しくは類似体は、本発明の範囲に包含される。

## 【0048】

本願の発明者らは、いずれの理論にも拘束されることを意図するものではなく、本願で開示されたヒトアルテミンタンパク質、並びに他の組織及び種からのオルソログは、TGF- $\beta$ スーパーファミリーの他の因子で公知であるものと一致するように、それらの生物学的に活性な形態で、ダイマーとして存在すると考えられる。

## 【0049】

ホモダイマーの他に、アルテミンダイマーのモノマー単位は、アルテミンの少なくとも一のモノマーを含む、安定な成長因子のヘテロダイマー若しくはヘテロマルチマーを構築するために利用され得る。この構築は、アルテミンのホモダイマーをその構成モノマー単位に解離させ、第二の、又はその後のホモダイマー成長因子のモノマー単位の存在下で、再び会合させることにより行うことができる。この第二の、またはその後のホモダイマー成長因子は、多様な成長因子から選択することができる。ニューロツリン、ペルセフィン、NGFや、BDNFや、NT-3や、NT-4/5のようなNGFファミリーメンバー、TGF- $\beta$ のスーパーファミリーのメンバー、血管内皮成長因子、CNTF/LIFファミリーのメンバー等などが第2ホモダイマー成長因子として挙げられる。アルテミンのヘテロダイマー若しくはヘテロマルチマー、および一以上の他の成長因子を生成することにより、生成したハイブリッド成長因子は、異なる組織分布を優先的に有する少なくとも2つの明確なレセプター類型に結合できると予想される。こうして得られたヘテロダイマー若しくはヘテロマルチマーは異なり、おそらく細胞の拡大スペクトルを示すことが予想されている。ヘテロダイマー若しくはヘテロマルチマーは細胞に作用するか、より大きな効能を提供することが可能である。また、ヘテロダイマー若しくはヘテロマルチマーは、ホモダイマー若しくはホモマルチマーでは観測されない相乗効果を提供することも可能である。例えば、異なるクラスからの因子の組み合わせにより、乏突起神経膠細胞の長期生存を促進することが明らかにされたのに対し、同じクラス内の単一因子やその組み合わせは短期の生存を促進した(Barres他、Development 118:283-295, 1993)。

## 【0050】



ヘテロダイマーは多くの方法で構成することができる。例えば、ホモダイマーを混合して、解離／展開試薬の存在下で解離／展開を起こす条件に晒し、次いで、モノマーの再会合とヘテロダイマー形成を可能にする条件に晒す。解離／展開試薬には、タンパク質の解離を促進することが公知である、任意の試薬が含まれる。かかる試薬には、以下のものに限定されないが、グアニジン塩酸塩、尿素、チオシアン酸カリウム、HCl緩衝液などのpH値を下げる試薬、さらにアセトニトリルまたはアルコール（プロパノール、イソプロパノールなど）など極性がある水混和性の有機溶剤などがある。さらに、ジスルフィド結合で共有結合されたホモダイマーについては、TGF- $\beta$ ファミリー因子の場合と同じく、ジチオールトレイトールや $\beta$ -メルカプトエタノールなどの還元剤を、解離／展開や再会合／再重複に用いることができる。

#### 【0051】

また、ヘテロダイマーも、ニューロトロフィンで行ったように、形質転換された細胞がヘテロダイマーを生成するように、2以上の因子で細胞を形質転換させることにより、作出させることができる(HeymachおよびShooter, J BiolChem 270:12297-12304, 1995)。ヘテロダイマーを生成させる別の方法は、アルテミンホモダイマーと第二の成長因子からのホモダイマーとを組合せ、その混合物を37℃でインキュベートさせる方法がある。

#### 【0052】

ホモダイマーからヘテロダイマーが生成する場合、例えば、予備的で、非変性ポリアクリルアミドゲルからの溶離などのように、当業者が利用できる方法を用いて、ホモダイマーからヘテロダイマーを分離させることができる。別の方法として、モノSカチオン交換カラム又は連続的免疫親和性カラムなどの高圧カチオン交換クロマトグラフィーを用いて、ヘテロダイマーを精製することができる。

#### 【0053】

成熟タンパク質配列のN末端にあるシグナル配列を持つ細胞内で、多くのタンパク質が合成されることは、本技術分野では周知であり、かかるリーダー配列を運ぶタンパク質は、プレタンパクと呼ばれる。タンパク質のプレ-部分はタンパク質の細胞処理の間に開裂する。プレ-リーダー配列の他に、多くのタンパクが

成熟タンパク質の安定な前駆体であるタンパク質上の領域を示す明確なプロ-配列を含んでいる。プレ-領域およびプロ-領域の双方で合成されたタンパク質は、プレ-プロ-タンパク質と呼ばれる。他のTGF- $\beta$ ファミリーメンバーで発生することが公知であるプロセシングイベントに照らすと、発明者らは細胞内で合成されるアルテミンタンパク質の形態はプレ-プロ-アルテミンであると考えらる。

#### 【0054】

ヒト及びマウスプレ-プロ-アルテミンポリペプチドは、39のアミノ酸のシグナル配列（プレ-領域）のN-末端メチオニンを含有することが好ましいと考えられる（それぞれ、図2B；配列番号（SEQ ID NO）：48と49、それぞれ、配列番号（SEQ ID NO）：26と29のアミノ酸1-39）。全長のリーダ配列は、シグナル配列として作用するための配列には必ずしも必要ではなく、したがって、アルテミンのプレ-領域の定義内に、シグナル配列として作用しうる潜在能力、つまり、小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ体、形質膜等の一以上の細胞器官の膜に共翻訳的挿入を容易にする能力を保持する、断片、通常、N-末端断片が包含されることは公知である。また、別の成長因子のイソ型であるヒトフィブロblast成長因子-2がAUGの他にCGU開始コドンにて翻訳の別の開始をする限り、プレ-プロ-アルテミンポリペプチドがN-末端ロイシンを有する一以上のイソ型を有することも可能である（Arnaud他、Molecular and Cellular Biology 19: 505-514, 1999）。よって、イソ型はシグナル配列としての機能を果たす限り、プレ-プロ-アルテミンのイソ型は、例えば、ゲノムヒトアルテミン配列（図14を参照）のヌクレオチド284にあるCTG開始コドンのスタート点のあるメチオニンの前、或いはヌクレオチド329にあるCTG開始コドンのスタート点のある同じメチオニンの後で開始する。かかる総てのイソ型は本発明の範囲に包摂される。

#### 【0055】

さらに、非-アルテミンプレ-プロ-領域と成熟アルテミンとを含有するポリペプチドと、並びにかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとを、本発明の範囲内に包含される。そのポリペプチドは非アルテミンプレ-プロ-領

域の開裂の際に成熟アルテミンを産出し、そのポリヌクレオチドは、非アルテミンプレ-プロ領域の開裂の際に成熟アルテミンを生じさせるポリペプチドを産出するように、発現システムにて利用され得る。かかる非-アルテミンプレ-プロ-領域ポリペプチド及びコーディンポリヌクレオチドは本技術分野では周知であり、ニュールツリン若しくはペルセフィンのような別の成長因子からのプレ-プロ-領域を有する。ただし、本願で開示したプレ-プロ-領域として機能する限り、任意のプレ-プロ-領域は利用することができる。

#### 【0056】

アルテミンプレ-プロ-領域がプロ-ドメインに続き、そのプロ-ドメインは成熟アルテミンのN-末端アミノ酸の直前のRXXRコンセンサス部位で終端していることが好ましい。よって、成熟ヒト及びマウスアルテミンは、図1A及び図2Bに示す三つのRXXRコンセンサス配列（ヒトではRAARR、RGG RとRAARRで、マウスではRLTR、RGARとRAARR）のうちのその後で、ヒト及びマウスプロ-アルテミン（それぞれ、配列番号（SEQ ID NO）：40と41）のタンパク質分解開裂により生じると考えられている。もっとも、開裂はさらなるイソ型を産出させるための幾多の別の非コンセンサス部位へ起こることが可能である。かかる総てのイソ型は本発明の範囲に包含される。

#### 【0057】

ヒトプロ-アルテミンのN-末端に続く第一のRXXR配列後の開裂により、図3Cに示す成熟ポリペプチド（配列番号（SEQ ID NO）：5）を産出する。同様に、第二の及び第三のRXXR配列後の開裂により、それぞれ、図3B（配列番号（SEQ ID NO）：4）と図3A（配列番号（SEQ ID NO）：3）に示す成熟ヒトポリペプチドが産出する。類推すると、予想された成熟マウスアルテミン配列は配列番号（SEQ ID NO）：34、35及び36である。後述する生物学的アッセイに基づくと、それぞれ、好適な成熟ヒトアルテミンは配列番号（SEQ ID NO）：3からなり、同様に、好適な成熟マウスアルテミンは配列番号（SEQ ID NO）：34からなる。よって、好適なヒトプロ-領域のポリペプチドは、図2B（配列番号（SEQ ID NO）：50）のアミノ酸40-107を含み、対応す好適なマウスプロ-領域ポリペプチドは図2B（配列番号（SEQ ID NO）：51）のアミノ酸40-1

11を含む。同様に、よって、好適なヒトプレ-プロ-領域のポリペプチドは図2B（配列番号（SEQ ID NO）：52）のアミノ酸1-107を含み、対応する好適なマウスプレ-プロ-領域のポリペプチドは図2B（配列番号（SEQ ID NO）：53）のアミノ酸1-111を含む。成熟分泌アルテミン分子はTGF- $\beta$ ファミリーの他メンバーの類推からジスルフィド結合ホモダイマーを形成する蓋然性が高い。

#### 【0058】

ヒト及びマウスの好適なプレ-領域のポリヌクレオチドは、図1B（配列番号（SEQ ID NO）：54）のヌクレオチド1-117と、図1C（配列番号（SEQ ID NO）：55）のヌクレオチド1-117とを、それぞれ含み、ヒト及びマウスプロ-領域ポリヌクレオチドは、図1B（配列番号（SEQ ID NO）：56）のヌクレオチド118-321と、図1C（配列番号（SEQ ID NO）：57）のヌクレオチド118-333とを、それぞれ含み、ヒト及びマウスプレ-プロ-領域のポリヌクレオチドは、図1B（配列番号（SEQ ID NO）：58）のヌクレオチド1-321と、図1C（配列番号（SEQ ID NO）：59）のヌクレオチド1-333とを、それぞれ含む。なお、既述の別のスタート点と別の非コンセンサス開裂点により、プレ-プロ-アルテミン及び成熟アルテミンの別のイソ型に対応する配列をコードする。

#### 【0059】

本発明による好適なアルテミンは、組換えDNA技術により調製される。もっとも、アルテミンはニュールツリンに対して実行されたのと同じように、細胞の調製済み培地から精製された形で単離され得る。

#### 【0060】

「純粋な形」、「精製された形」又は「実質的に精製された形」とは、アルテミンでない他のタンパク質が実質的に存在しないアルテミン組成物を意味する。実質的に精製されたアルテミン組成物は、全タンパク質、つまり存在する他の高分子種とのモルに基づく比較において、少なくとも約50%のアルテミンを含むことが好ましい。より好ましくは、実質的に精製されたアルテミン組成物とは、全タンパク質、つまり存在する他の高分子種とのモルに基づく比較において、少

なくとも約80モル%乃至90モル%を、更に好ましくは少なくとも約95モル%以上のアルテミンを含む。

#### 【0061】

組換えアルテミンは、適切に形質転換された宿主細胞の中でアルテミンをコードするDNA配列を発現することによって作出させることができる。本技術分野で周知の方法を用いて、アルテミンをコードするDNAを発現ベクターへ結合し、宿主細胞内へ形質転換し、形質転換細胞によるアルテミンの発現に適した条件を設定することができる。

#### 【0062】

任意の適切な発現ベクターを利用して組換えアルテミンを産出させることができる。例をあげると、哺乳類の発現ベクターpCB6(Brewer, Meth Cell Biol 43:233-245, 1994)や、大腸菌 pET発現ベクターなどがあるが、特に、pET-30a(Studier他, Methods Enzymol 185:60-89, 1990 参照により本文に採用)はよく知られている。哺乳類細胞及びバクテリア細胞内の発現に好適なその他の発現ベクターは本技術分野では公知であり、酵母や昆虫の細胞で使用するための発現ベクターがある。また、バキュロウイルス発現系を使うこともできる。

#### 【0063】

数多くの細胞類型は、組換えアルテミンの発現用宿主細胞として適する。哺乳類宿主細胞には、以下のものに限定されないが、モンキーCOS細胞、中国産ハムスター卵巣(CHO)細胞、ヒト腎臓293細胞、ヒト表皮A431細胞、ヒトコロ205細胞、CV-1細胞、他の形質転換霊長類セルライン、正常2倍体細胞、一次組織のインビトロ培養由来細胞菌株、一次外植体、ヒーラー細胞、マウスL細胞、BHK、HL-60、U937、HaKとジャルカット(Jurkat)細胞がある。適切な宿主細胞としての機能を果たす酵母菌株には、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces*菌株、*Candida*や、異種タンパク質を発現することができる任意の他の酵母がある。宿主バクテリア菌株には、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、*Salmonella typhimurium*や異種タンパク質を発現することができる任意の多のバクテリア菌株がある。ポリペプチドは酵母若しくはバクテリア中で産出される限り、生物学的に活性なポリペ

プチドを入手するために、公知な化学的若しくは酵素方法を利用して、例えば、適切な部位のホスホリレーションまたはグリコシレーションによりポリペプチドを修飾させる必要がある。

#### 【0064】

また、本発明のポリペプチドは、形質転換植物や（例えば、米国特許第5,679,880号を参照するとよい）、例えば、体細胞又は生殖細胞にヒトアルテミンをコードするヌクレオチド配列を有する雌ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ形質転換動物にて、発現され得る。

#### 【0065】

発現アルテミンポリペプチドは、ゲル濾過やイオン交換クロマトグラフィのよいうな公知の精製方法を利用して精製され得る。また、精製には、成熟アルテミン又はその断片に対して育成させたポリクローナル若しくはモノクローナル抗体のようなアルテミンポリペプチドと特に結合する薬剤を利用したアフィニティクロマトグラフィーもある。タンパク質精製に、通常利用されるその他の親和性樹脂も利用可能である。例えば、コンカナバリンA - アガロース、ヘパリン - トヨパール（登録商標）やシバルコムブルー43GAセファローゼ（登録商標）などがある。さらに、アルテミンの精製には、フェニルエーテル、プチルエーテルまたはプロピルエーテルのような樹脂を利用した疎水性相互作用クロマトグラフィが関係する一以上の工程が含まれる。

#### 【0066】

また、アルテミンポリペプチドは、精製を容易にするために融合タンパク質として発現されとも考えられる。かかる融合タンパク質は、例えば、pETバクテリア発現系にて発現されるとき、並びにアルテミンアミノ酸配列がマルトース結合タンパク質（MBP）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）又はチオレドキシン（TRX）のアミノ酸配列に融合した際に、ヒスチジンtagへ融合するアルテミンアミノ酸配列を含む。同様に、本発明のポリペプチドは異種エпитープと結合（tagged）し、その後、特にかかるエпитープと結合する抗体を利用したイムノアフィニティクロマトグラフィにより精製される。発現用のキット及びかかる融合タンパク質の精製、並びに結合タンパク質は市

販されている。

#### 【0067】

さらに、アルテミン及びその断片は、当業者には公知な方法を利用して化学合成により生成され得る。

#### 【0068】

アルテミンはモノマー単位で発現され、かかるモノマー形態は還元条件下にて調製若しくは合成により生成され得る。かかる例では、再重複及び再生は、タンパク質の解離/会合を促進させることが公知である既述した薬剤の一を利用して達成される。例えば、モノマー形はジチオトレイトールによりインキュベートされ、続いて酸化グルタチオン二ナトリウム塩でインキュベートされ、次いで、尿素のような再重複剤を含有する緩衝液でインキュベートさせる。

#### 【0069】

多くのRXXR開裂部位はプロ-アルテミン配列に存在するので、成熟アルテミンのイソ型が存在すると考えられる。さらに、別の非コンセンサス開裂部位も異なるイソ型が生じる。よって、成熟アルテミンポリペプチドは第一のカノニカルシステインに先行する可変の数多くのアミノ酸を有する。かかる別の開裂部位はさまざまな異物体間と同じ生物体間のさまざまな組織を、別異に利用する。TGF- $\beta$ ファミリーメンバーの成熟形の7つの保存システインの第一のシステインに先行するN-末端アミノ酸は、長さ及び配列ともに大いに変化する。さらに、10のアミノ酸配列を第一の保存システインの残基上流への挿入しても、あるファミリーメンバーである、ドルサリン(dorsalin)の公知な生物学的活性に影響を及ぼさない(Baster他、Cell 73: 687-702, 1993)。類推により、第一のカノニカルシステインに先行する異なる長さの配列を含有するアルテミンタンパク質は存在し、又は作出され、しかもその生物学的活性は保持され则认为られる。

#### 【0070】

また、本発明は、本願で開示する任意のヒト及びマウスアルテミンポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを包含する。本願で使用するポリヌクレオチドには、DNA及び/又はRNA、したがって

、DNA配列がチミン残基と置換されたウラシルのある同一のRNAを含むように、配列リストに記述されたヌクレオチドをも含む。本発明に含まれるヌクレオチド配列には、それぞれ、図1Bと図1Cに記載されたヒト及びマウスプロ-アルテミンアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と、並びに図1Dに示す変種ヒトアルテミンタンパク質をコードするヌクレオチド配列及びヒトとマウスプロ-アルテミン（それぞれ、配列番号（SEQ ID NO）：40と41）をコードするヌクレオチド配列とがある。ヒトプロ-プロ及びプロ-アルテミンをコードする好適なポリヌクレオチドは、それぞれ、配列番号（SEQ ID NO）：24と42とを含み、マウスプロ-プロ及びプロ-アルテミンをコードする好適なポリヌクレオチドは、それぞれ、配列番号（SEQ ID NO）：27と43とを含む。本発明の範囲内のポリヌクレオチドには、単離された染色体は含まない。

#### 【0071】

さらに、本発明は、それぞれ、任意の配列番号（SEQ ID NO）：3乃至5と任意の配列番号（SEQ ID NO）：34乃至36とからなる成熟ヒト及びマウスポリペプチドのような成熟ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを包摂する。成熟アルテミンをコードするかかるポリヌクレオチドには、配列番号（SEQ ID NO）：6乃至8で記述されるヒトヌクレオチドと、配列番号（SEQ ID NO）：37乃至39で記述されるマウスヌクレオチド配列とがある。特定の好適なポリヌクレオチドは配列番号（SEQ ID NO）：3をコードし、配列番号（SEQ ID NO）：6を含む。

#### 【0072】

縮重ヌクレオチド配列は本願で説明するアルテミンアミノ酸配列をコードすることができ、また本発明の範囲内に包含されることは、当業者には理解できる。例えば、配列番号（SEQ ID NO）：44は位置582のAよりもむしろGを含有するがコードされたアミノ酸配列を変化させない、本願の発明者らにより単離されたあるヒトcDNAクローンにて見出されたアルテミンコーディング配列を表わす。かかる縮重ヌクレオチド配列には、天然の配列の修飾物があり、少なくとも一のコドンは、大腸菌又は昆虫細胞のような一定の宿主細胞により好まれる対応した縮重コドンで置換され、その中の組換えアルテミンの発現を改善させる。



## 【0073】

また、本発明は、本発明の範囲内に包摂される、任意のアルテミンをコードするヌクレオチド配列と操作可能に結合した発現調節要素を含むベクターを包含する。さらに、本発明はかかるベクターにより形質転換された任意の変種の宿主細胞を含む。

## 【0074】

さらに別の実施態様では、ヒトアルテミンをコードするポリヌクレオチド又はその相補体と特にハイブリダイズするポリヌクレオチドが開示される。特定ハイブリダイゼーションは、オリゴヌクレオチドを含むポリヌクレオチドと、特定基準ポリヌクレオチド（例えば、ヒトアルテミンをコードするヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）との間のハイブリッド形成として、本願では定義され、ポリヌクレオチドは他の非アルテミンポリヌクレオチドに優先して特定基準ポリヌクレオチドとハイブリダイズする。具体的なハイブリダイジングオリゴヌクレオチドは、通常、長さで少なくとも15のヌクレオチドであり、好ましくは少なくとも17から少なくとも20のヌクレオチドの長さである。他の好適な長さには、少なくとも22から少なくとも25のヌクレオチドがある。特に基準配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドは、任意の長さであり、例えば、約15のヌクレオチドから約100のヌクレオチドまで若しくは約1000のヌクレオチド又は約10,000以上のヌクレオチドまでである。特定のハイブリダイゼーションは、高度なストリジェンシー条件下で実行されることが好ましく、また、当業者には理解されるように、温度、イオン強度、ハイブリダイゼーションの長さ又は洗浄時間と、ホルムアミドの濃度を含むハイブリダイゼーション中及び洗浄中の幾多の因子を調整することにより、容易に定められる（例えば、Sambrook, FritschとManiatis., Molecular Cloning: a Laboratory manual, 2d Ed. Vols. 1 - 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview N. Y. 11803, 1989を参照するとよい）。

## 【0075】

また、本発明は生存又は成長促進活性を有し、しかもヒト若しくはマウスアルテミンと結合しない抗体よりも優先して、アンチ-ヒト若しくはアンチ-マウス

アルテミン抗体と結合するアルテミンポリペプチドをコードする核酸配列をも包含する。

#### 【0076】

さらに、本願ではアルテミンを産出する方法をも開示する。調製は、細胞類型はアルテミンを産出する限り、多様な細胞類型からの調製済培地からの単離により行われる。第二の好適な方法には、アルテミンをコードする核酸配列を単離し、適正な調節配列に沿って前記配列を適するベクター及び細胞類型ヘクローニングし、アルテミンを産出するように前記配列を発現させることによる、組換え方法の利用を含む。

#### 【0077】

ニューロツリンの配列とアルテミンの構造的類似性を基礎として、GDNF及びベルセフィン、アルテミンはニューロン細胞並びに非ニューロン細胞の生存及び成長を促進させることが予想される。前述したように、GDNF、ニューロツリン及びベルセフィンは、抹消及び中枢神経システムのニューロン集団の幅広いスペクトルに影響を及ぼす。さらに、現在までに単離された他の総ての成長因子は、多くの異なる細胞類型に作用することが明らかになっている（例えば、参考として援用される、ScullyとOtten, Cell Biol. Int 19: 459-469, 1005; Hefti, Neurotrophic Factor Therapy 25: 1418-1435, 1994を参照するとよい）。非ニューロン組織に及ぼす神経栄養因子の作用の例として、プロトタイプの神経栄養因子であるNGFも、新生児ラットへ注射した際に、マスト細胞に作用し、それらの数を増大させる（Aloe, J Neuroimmunol 18: 1-12, 1988）。加えて、マスト細胞はtrkレセプタを発現し、NGFがマスト細胞分泌促進薬であり、生存促進因子であるように、NGFに応答する（Horigome他, J. Biol Chem 269: 2695-2707, 1994）。さらに、TGF- $\beta$ スーパーファミリーのメンバーは異なる機能と発生オリジンの多くの細胞類型に作用する。

#### 【0078】

よって、アルテミンは、抹消及び中枢細胞だけでなく非ニューロン細胞の多様な異なるニューロン細胞に栄養活性を作用する蓋然性が高い。ニューロン細胞に関して、アルテミンは、交感ニューロンと、神経冠と水晶体板由来（placodally

-derived) 感覚神経を含む、今までに調査した総ての抹消神経節からのニューロンの生存を支援し、またCNSニューロンの少なくとも一つの集団、つまり、ドーパミン作動性中脳ニューロンの生存を支援する。その他に、本願の発明者らは、心臓、腎臓、肺、抹消白血球及び骨髄を含む、数多くの大人組織及び胎児組織におけるアルテミン発現を検出し、アルテミンが多様なニューロン細胞及び非ニューロン細胞への栄養サポートを提供するという結論を裏付ける。これは、血造、炎症、アレルギー及び心筋脂肪症においてアルテミンがある種の役割を果たすことを示唆している。アルテミンの任意の特定ターゲット細胞類型に及ぼす栄養活性は、標準的基準モデルを利用して、日常的な実験により定めることができる。

#### 【0079】

また、本発明は、一以上の他の非アルテミン成長因子の少なくとも一の活性ドメインと組合せた少なくとも一の活性ドメイン合成のパン - 成長因子をも考慮する(例えば、Ilah他、Proc Natl Acad Sci 92: 607 - 611, 1995を参照するとい)。上記のパン - 成長因子は組合せた活性又はアルテミン及び一以上の他の成長因子の他の有利な性質を有することが予想される。それ自体では上記のパン - 成長因子は能力を有すると考えられ、幅広いスペクトルの変性病及び活性ドメインが得られる親因子の何れか若しくは総てにより治療されうる症状の治療にて有用である多特異成長因子であると考えられる。また、かかるパン - 成長因子は親の因子の活性以上の相乗効果を提供する(Barres他、前掲)。

#### 【0080】

本発明の範囲に含まれるパン - 成長因子には、少なくとも2つの成長因子の断片部分から構成されるキメラまたはハイブリッドポリペプチドは包含される。TGF- $\beta$ スーパーファミリーの成長因子は構造的に関連しており、高度に保存された配列の標識をもち、ファミリーメンバーの識別に役立つ。特に、7個のカノニカルフレームワークシステイン残基はスーパーファミリーメンバー中でほとんど不変である(Kingsley, Genes & Dev 8:133-146, 1994、参考として援用される)。したがって、キメラのポリペプチド分子は、一以上の交差点までのアルテミン分子の部分と実質的に同一の配列と、対応した一以上の交差点の反対側に延び

る別のTGF- $\beta$ スーパーファミリーメンバーの一部分と実質的に同一の1以上  
 の各配列とから構成することができる。例えば、アルテミンポリペプチドのアミ  
 ノ末端の端部の一部はニューロツリンポリペプチドのカルボキシ末端の端部の一  
 部と結合されうる。或いは、ニューロツリンポリペプチドのアミノ末端の端部の一部  
 はアルテミンポリペプチドのカルボキシ末端の端部の一部に結合されうる。アル  
 テミン又はニューロツリンポリペプチドのかかる部分は、好適には、約5～約9  
 5個、より好適には、約10～約90個、更に好適には約20～約80個、最も  
 好適には約30～約70の隣接するアミノ酸であり、他の非アルテミン又は場合  
 によっては非ニューロツリンのTGF- $\beta$ スーパーファミリーメンバーのかかる  
 部分は、好適には約5～約95個、より好適には約10～約90個、更に好適に  
 は約20～約80、最も好適には約30～約70個の隣接するアミノ酸である。  
 例えば、3番目のシステイン残基と4番目のカノニカルフレームワークシステイ  
 ン残基との間には、特定の交差点があるかもしれない。特定の非アルテミンTGF- $\beta$   
 ファミリーメンバーは、以下のものに限定されないが、トランスフォーミ  
 ング成長因子 $\beta$ 1(TGF $\beta$ 1)、トランスフォーミング成長因子 $\beta$ 2(TGF $\beta$ 2)、トランスフォーミ  
 ング成長因子 $\beta$ 3(TGF $\beta$ 3)、インヒビン $\beta$ A(INH $\beta$ A)、インヒビン $\beta$ B(INH $\beta$ B)、結節性遺伝子(NODAL)、骨形態発生タンパ  
 ク類2および4(BMP2とBMP4)、ショウジョウバエ・デカペンタプレジック(D  
 rosophila decapentaplegic)遺伝子(dpp)、骨の形態発生タンパク類5-8(BM  
 P5、BMP6、BMP7及びBMP8)、ショウジョウバエ60A遺伝子ファミリー(6  
 0A)、骨形態発生タンパク3(BMP3)、Vg1遺伝子、成長分化因子1と3(GDF  
 1とGDF3)、ドルサリン(drsln)、インヒビン $\alpha$ (INH $\alpha$ )、MIS遺伝子、成  
 長因子9(GDF-9)、グリアル由来神経栄養成長因子(GDNF)、ニューロツリン(NTN  
 )及びペルセフィンを含むファミリーメンバーから選択され得る。更に、追加的  
 な交差点は所望の数のペルセフィン部分又は断片を任意の1つ以上の他のファミ  
 リーメンバーの部分又は断片に組み入れるのに使用されうる。

#### 【0081】

特定のキメラ分子を構築するには、アルテミンの一部と、他方の部分、つまり  
 非アルテミン成長因子をPCRを用いて増幅し、混合して、PCR反応用の鋳型

として使用する。この反応にはキメラ分子の2つの構成部分の一方からのフォワードプライマーと、他方からのリバースプライマーを使用する。そこで、アルテミンをコードするプラスミドを鋳型として使用して、最初から第3および第4カノニカルシステイン残基の間の選択交差点までのアルテミンの部分を増幅するために、例えば、フォワードプライマー及びリバースプライマーが選択される。アルテミン配列と重複する5'部分のあるフォワードプライマーと、リバースプライマーを用いて、他方の部分、つまり対応交差点から3'末端までのTGF- $\beta$ スーパーファミリーの非アルテミン成長因子を増幅させる。鋳型には、非アルテミンTGF- $\beta$ ファミリーメンバーのコーディング配列を含むプラスミド鋳型を使用する。2つのPCR反応から得られた産出物をゲルで精製し、混合してPCR反応を行う。上記反応のアリコートを鋳型として、PCR反応は非アルテミン成長因子のアルテミンのフォワードプライマー及びリバースプライマーを用いて行う。次に、産出物をキメラ分子産出のため、発現ベクターへクローニングする。

#### 【0082】

キメラ成長因子は細胞の成長と発達の促進に有効なことが予想され、ニューロン特有の細胞の萎縮や変性、壊死の予防に使用できることが期待される。また、キメラポリペプチドは、キメラポリペプチドを構成する他の任意の成長因子の同一レセプターの拮抗剤として作用する可能性があり、また上述のレセプターで作用するその他の成長因子の拮抗剤としても作用する可能性がある。

#### 【0083】

また、本発明は、細胞変性又は機能低下した患者の細胞に栄養サポートを提供するために有効量のアルテミンポリペプチドを含む治療又は薬学組成物と、半ジボ又はインビボの細胞にアルテミンポリペプチドの治療に有効な量を投与することを含む方法を包含する。本願で利用する用語「栄養サポート」とは、アルテミンのような成長因子は細胞に十分な栄養を提供し、その細胞は少なくとも一以上の正常な機能を維持若しくは回復することを意味する。

#### 【0084】

本発明の組成物及び方法は、数多くの変性疾患及び退行性疾患の治療に有用であ

る。細胞変性、機能不全又は退性がニューロンと関係する場合、以下の疾病に限定されないが、末梢（ニューロパシー）神経障害、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン氏病、ハンチントン病、虚血性発作、急性脳傷害、急性脊髄傷害、ニューロブラストーマのような神経系腫瘍、多発性硬化症、末梢神経外傷又は負傷、神経毒由来傷害、糖尿病また腎不全及び感染剤により引き起こされる損傷のような代謝不全症がある。加えて、アルテミン組成物は特異性便秘症、またはパーキンソンズ病、脊髄索損傷又はオピエート鎮痛剤の使用と関連した便秘症のような腸に関連する疾患を治療するために利用することも可能である。細胞変性又は機能不全には骨髄細胞のような非ニューロン細胞が関係する限り、アルテミンは、例えば、好酸球減少及び／又は好塩基球減少を含む白血球減少、リンパ球減少、単球減少、好中球減少、貧血、血小板減少並びに上記のいずれかの幹細胞の機能不全のような血液細胞の機能不全の疾患を含む症状を治療するには有用である。また、細胞変性又は機能不全には、心筋症及びうっ血性心臓疾患のような症状の心筋層筋肉細胞が関係している。その他に、小さな細胞肺のカルチノーマは、アルテミンポリペプチド組成物又はポリヌクレオチド組成物を利用して治療され得る。

#### 【0085】

アルテミンによる腸に関する疾患の治療は、腸管神経症の治療を含む。腸管神経システムは、胃腸運動性を含む胃腸システムの機能を制御する神経の複雑な集まりである。NT-3による初期の臨床研究から、本神経栄養因子は正常なボランティア及び抹消神経障害に苦しんでいる患者における胃腸運動性を活発にさせることが明らかにされた。同様に、アルテミンだけでなく成長因子のGDNF／ニューロツリン／ペルセフィンファミリーの他メンバーも、腸ニューロンに活性を示すものと考えられる。結果として、アルテミンは深刻な特異性便秘症に苦しむ患者だけでなく、パーキンソン病、脊髄索損傷、オピエート鎮痛剤等の使用に関連する便秘症に苦しむ患者のような腸管神経障害を治療する際に有用であると考えられる。

#### 【0086】

アルテミンが特定の細胞類型又は組織の治療に有効か否かは、本技術分野にて

公知で多様なアッセイのいずれかを利用して、当業者に容易に求めることができる。例えば、細胞に栄養サポートを提供することに関して、栄養因子により有益な生化学的及び形態学的効果がもたらされ、ある状況下では細胞生存を促進する。ニューロンに関しては、ニューロンの栄養サポートを奪うことは代謝活性を低下させること、つまり、正常な機能及び成長に必要とされるグルコース摂取、RNA合成及びタンパク合成を低下させることは当業者には公知である (Deckwert hとJohnson, J. Cell Biol. 123: 1207-1222, 1993)。また、栄養サポートを排除すると、ニューロンの細胞体のサイズが減少する。思うに、影響因子の代謝効果の損失の結果として、栄養因子の欠乏により発芽後成長過程の低下又は停止し、ニューロン過程が後退する。ニューロン生物学の上記態様の栄養因子の要件のほかに、ニューロンは生存を維持させるために神経栄養因子を必要とする。よって、生存アッセイがしばしば利用される手段であり、神経栄養因子の作用の検出又は定量化する。しかしながら、また、栄養サポートは、形態学的、生化学的及び機能変化として明白であり、ニューロンメンバー又は生存に及ぼす効果には無関係である。

#### 【0087】

前述したように、成長因子は細胞に栄養サポートを提供するのに加えて、細胞分化をも生じさせる。よって、アルテミンポリペプチド及びポリヌクレオチドは、癌細胞のような未分化細胞の細胞分化を生じさせるために、有利に利用可能であると考えられる。特に、アルテミンはニューロblastomaのような神経系腫瘍の治療に利用し得る。加えて、小さな細胞肺カルチノーマはRETを発現させることが公知である。したがって、また、アルテミンは小さな細胞肺カルチノーマを治療するために利用可能であるとも考えられる。

#### 【0088】

さらに、栄養サポート及び／又は分化の惹起は、GFR $\alpha$ 3ポリペプチドに呼応したアルテミンポリペプチドを投与することにより、又は本願で説明するアルテミンポリペプチド又はアルテミンポリヌクレオチドの投与方法を利用して、アルテミンポリヌクレオチドとGFR $\alpha$ 3ポリヌクレオチドを投与することにより、達成される。前記したように、マウスGFR $\alpha$ 3がまず、GFR $\alpha$ 1及びGF

R $\alpha$ 2と相同である発現配列Tag (EST)として同定された(Baloh他、1998、前掲; Jing他、1997、前掲; Naveilhan他、Proc Natl Acad Sci USA 95, 1295-300, 1998; Widenfalk他、Eur. J. Neurosci. 10, 1508-1517, 1998; Worby他、J. Biol. Chem. 273, 3502-3508, 1998)。ヒトGFR $\alpha$ 3は、BLASTサーチアルゴリズムによるExpressed Sequence Tags (db EST database)のデータベースをサーチする疑問として、ヒトGFR $\alpha$ 2アミノ酸配列を利用して同定した(Altschul他、J. Mol. Biol. 215: 403-410; 参考として本願に援用される、1998年12月22日に本願と同時に特許出願した、発明名称「GFR $\alpha$ 3、GDNFコレセプタファミリーの新規なメンバー」を同時係属出願を参照)。同定されたEST配列の中に、幾つか(AA049894、AA050083、AA041935、AA238748)はGFR $\alpha$ 1又はGFR $\alpha$ 2と同一には対応しなかったが、双方の配列と有意な相同性を有していた。上記ESTに対応するクローンは、ワシントンユニバーシティESTプロジェクトから入手し、配列決定した。その内の一つは、本願の発明者がGFR $\alpha$ 3と名づけた全長のマウスcDNAに対応した。マウスcDNAからの配列情報はヒトゲノム及びcDNAクローンを同定するために利用し、対応するヒト及びマウスの予想されたタンパク質配列を、図12に示す。ヒト及びマウスGFR $\alpha$ 3の予想されたアミノ酸配列から、推定N-末端シグナル配列(図12の、hGFR $\alpha$ 3のアミノ酸1から31と、mGFR $\alpha$ 3のアミノ酸1から28)(Nielsen 他、Protein Eng. 10: 106, 1997)成熟GFR $\alpha$ 3ポリペプチド(図12の、hGFR $\alpha$ 3のアミノ酸32から372とmGFR $\alpha$ 3のアミノ酸29から369)、関連タンパク質に存在するのと同様に(Klein他、Nature 387: 717-721, 1997; Jing他、Cell 85: 1113-1124, 1996; Treamor他、Nature 382: 80-83, 1996; Baloh他、Neuron 18: 793-802, 1997)、GFR $\alpha$ 1及びGFR $\alpha$ 2三つの推定N-結合グリコシレーション部位と、GPIシグナルペプチドと一致するC-末端の残基の疎水性ストレッチ(図12の、hGFR $\alpha$ 3のアミノ酸373から400と、mGFR $\alpha$ 3にアミノ酸370から397(Undenfriend他、Annu. Rev. Biochem. 64: 563-591, 1995)を有する約38.8 kDaタンパク質であることが明らかになった。GFR $\alpha$ 3前駆体(配列番号(SEQ ID NO): 65)をコードするヒ



トヌクレオチド配列を図13に示す。本前駆体配列には、N-末端シグナル配列(図13のヌクレオチド1から93)のコード化配列と、成熟GFR $\alpha$ 3(図13のヌクレオチド94から1116)のコード化配列とGPIシグナルペプチド(図13のヌクレオチドの1117から1203)と一致する残基のC-末端疎水性ストレッチのコード化配列がある。

#### 【0089】

後述するように、アルテミンはRET不存在下でGFR $\alpha$ 3と結合し、生じるリガンド/コレセプタ複合体はターゲット細胞により発現されたRETレセプタと結合し、且つ、活性化させることが可能である。よって、アルテミン及びGFR $\alpha$ 3による治療は、アルテミンに通常応答する細胞の感度を増大させることが予測され、RETを発現するが、アルテミンには通常応答しない細胞に栄養サポートを提供することも予測される。アルテミンポリペプチド及びGFR $\alpha$ 3ポリペプチドは同じ種、つまり、ヒト由来であることが好ましい。また、GFR $\alpha$ ポリペプチドは溶解形、つまり、細胞膜による潜在的に不必要な相互作用を回避するためのGPI結合が欠乏している。本願で利用するように、GFR $\alpha$ 3ポリペプチドはGPIアンカーの有無に関係ない成熟タンパク質、並びにGFR $\alpha$ 3断片、特にGPIアンカーが欠如し、アルテミン及びRETの双方と結合することができ、かかる結合によりRETの活性化に至らしめる溶解断片を包含することを意図している。

#### 【0090】

ある条件の下では、発現アルテミンの量を調整するか減少させるのが望ましいかもしれない。よって、本発明の別の態様では、アルテミンアンチセンスオリゴヌクレオチドが産出され、細胞のアルテミン発現のレベルを、それぞれ減らすため利用される方法は、一以上のアルテミンアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与することを含む。「アルテミンアンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、ヌクレオチド配列を持ち、塩基対の組合せを通じて、特定の相補的核酸配列と相互作用するオリゴヌクレオチドを意味する。この相補的核酸配列はアルテミンの発現が減少されるように、アルテミンの発現に関係する。好適には、アルテミン発現に関係する特定の核酸配列には、アルテミン遺伝子の配列を含むゲノムDNA

分子からmRNA分子がある。よって、本発明は、アルテミン遺伝子のフランキン  
グ領域と、アルテミンmRNAの未翻訳領域と、アルテミン遺伝子のプレ-又は  
プロ部分若しくは成熟アルテミントタンパク質のコーディング配列と塩基対を形成  
し得るアルテミンアンチ-センスオリゴヌクレオチドを考慮する。アルテミンア  
ンチセンスオリゴヌクレオチド及びかかる配列と十分に相補的である手段の方法  
に関連するヌクレオチド配列に「相補的であること」という用語は、生理的条件  
下で細胞内の当該配列へのハイブリダイゼーションを可能にすることを意味する  
。アルテミンアンチセンス-オリゴヌクレオチドは、好適には、約8〜約100  
個のヌクレオチドを含む配列を含み、より好適には、アルテミンアンチセンスオ  
リゴヌクレオチドは、約15〜約30個のヌクレオチドから構成されることであ  
る。また、アルテミンアンチセンスオリゴヌクレオチドには、様々な一時変異を  
含む誘導体を含めることができる。この誘導体により、変異したヌクレオチドの  
相互結合 (Uhlmann & Peyman, Chemical Reviews 90:543-584, 1990; Schneider  
& Banner, Tetrahedron Lett 31:335, 1990) 変異核酸塩基及び/又は糖などに  
対して抵抗力が与えられる。

#### 【0091】

本発明の治療的又は薬学的組成物は、例えば、その経路には静脈、皮下、筋肉  
、経皮、硬膜下腔内、大脳内などを含む従来技術において公知の適切な経路で投  
与できる。投与は注射のように迅速な場合と、一定の期間に及ぶ輸液とか低速放  
出剤による投与のいずれかに分かれる。中枢神経系で組織を治療するために、投  
与は脳脊髄液(CSF)の中に注射が注入を使用することができる。アルテミン  
を中枢神経系の細胞に投与する場合、投与は血液脳関門を超えてアルテミンの浸  
透を促進することができる一種以上の薬剤を同時に使用することができる。

#### 【0092】

また、アルテミンは、所望の薬剤学的又は薬理学的性質を付与する薬剤と結合  
若しくは共有結合し得る。例えば、アルテミンは本技術分野では公知な任意の物  
質と結合し、抗体のような血液脳関門を超えてトランスフェリンレセプタへの浸  
透又は運搬を促進し、静脈内注射により投与される(例えば、Friden他, Scienc  
e 259: 373-377, 1993を参照するとよい)。さらに、アルテミンはポリエチレ

ングリコールのようなポリマーと安定的に結合し、溶解性、安定性、半減期という所望の性質及び他の薬学的に効果のある性質を得る（例えば、Davis他、Enzyme Eng. 4: 169-73, 1978; Burnham, Am J Hosp Pharm 51: 210-218, 1994を参照するとよい）。アルテミンは、ターゲット細胞へのアルテミンの運搬を制限するターゲット部分を含有するリポソーム又はポリマーのような担体で投与されることが好ましい。ターゲット部分の例には、以下のものに限定されないが、抗体、リガンド、特定細胞表面分子へのレセプタがある。

#### 【0093】

非腸管外投与では、また、組成物は粘膜の孔サイズを増大させる吸収エンハンサーを含む。かかる吸収エンハンサーには、デオキシコール酸ナトリウム塩、グリココール酸ナトリウム、ジメチル- $\beta$ -シクロデキストリン、ラウロイル-1-リソホスファチジルコリンと、粘膜のリン脂質ドメインと構造上類似性を有する他の物質がある。

#### 【0094】

一般に、本組成物は薬剤学的調製の形態で利用される。かかる調製は製薬技術では周知な方法で製造される。1つの好適な調製は、生理的食塩水のビヒクルを利用するが、その他の薬学的に許容な担体も検討され、例えば、その他の非毒性塩の生理的濃度、5パーセントのグルコース溶液、無菌水なども使用することができる。また、適当な緩衝液が組成物に存在することも望ましい。かかる溶液は、必要に応じて、凍結乾燥させうえて無菌アンプルに保存し、無菌水の添加によって容易に再形成し、ただちに注射できるように用意することができる。主要な溶媒は水であり、或いは、非水を溶媒として用いる場合もある。また、治療を必要とする組織に埋め込むことができる固形や、半固形の生物学的に相溶性のあるマトリックスにアルテミンを組み入れることもできる。

#### 【0095】

また、担体には薬学的に許容される他の賦形剤を用いて、組成物のpH、容量オスモル濃度、粘性、透明度、色、無菌性、安定性、溶離速度、臭気の変更あるいは維持を行うこともできる。同様に、担体に他の薬学的に許容できる賦形剤をさらに採り入れ、血液脳関門を越えて徐放、吸収または浸透を変更したり維持す

ることができる。かかる賦形剤は、単独投与か複数投与のいずれかによる非経口投与、継続的または周期的な注入によって脳脊髄液中に直接注入を行うべく調剤する場合に、一般に慣習的に使用される。

#### 【0096】

投薬は、投与配合物の薬物動力学的パラメータおよび使用される投与経路に応じて、繰り返すことができる。

#### 【0097】

また、アルテミンを含むある種の配合物は経口投与も利用されることも検討される。かかる配合物は、固形状の適当な担体と共に配合され、カプセル化されることが望ましい。好適な担体、賦形剤および希釈剤の例には、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、ガムアカシア、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、ケイ酸カルシウム、微晶質セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、ゼラチン、シロップ、メチルセルロース、メチルおよびプロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、マグネシウム、ステアリン酸塩、水、ミネラルオイル、その他の類似物質が含まれる。配合物には、潤滑剤、湿潤剤、乳化剤及び懸濁剤、保存剤、甘味剤または芳香剤を用いることもある。組成物が調合され、本技術では周知な手順をもちいて、患者へ投与を行った後、急速な放出、持続的な放出、徐々の放出など有効成分の放出スピードを調節するように調製することができる。また、組成物にはタンパク分解による変性を減少させる物質や、例えば表面活性剤などのように吸収を促進する物質も使用できる。

#### 【0098】

患者のおおよその体重若しくは体表面積、又は非占有体空間の体積に応じて、特定用量が算出される。また、投与量は選択した特定の投与経路に基づいて算出される。治療に適切な投与量を算出するのに必要な計算のさらなる精度は、当業者においては、通常行われていることである。かかる計算は、インビトロの特定の細胞類型のためのアルテミンの活性に基づいて、当業者により過度の実験を必要とせずに行われる。培養中のさまざまな抹消及び中枢ニューロンに及ぼすアルテミンの活性を後述し、特定のターゲット細胞類型に及ぼすアルテミン活性は、

通常の実験により求めることができる。正確な投与量は、標準的な投与 - 応答研究と共に定めることができる。実際に投与される組成物の量は、被治療状態若しくは症状、被投与組成物の選択、年齢、体重、個々の患者の応答、患者の症状の深刻度、投与の選択経路投を含む状況に照らし、医者が決めることは理解される。

#### 【0099】

本発明の一の実施例として、アルテミンを患者のベクターまたは細胞に治療的に移植することにより投与することである。ベクターまたは細胞は生物学的に活性を示すアルテミン又はアルテミンの前駆体の形、つまり、体内でアルテミンの生物学的に活性な形態へ容易に変換し得る分子を産出できる。一の方法では、アルテミンを分泌する細胞を半透過性の膜でカプセル化させ、患者に移植される。細胞は、一般にアルテミン又はアルテミンの前駆体を発現する細胞を用いてもよく、アルテミン又はアルテミンの前駆体を発現させるため形質転換された細胞を用いてもよい。ある実施例では、細胞が、好ましくは溶解形態であるアルテミン及びGFR $\alpha$ 3の双方を発現し、且つ、分泌するように形質転換される。患者がヒトである場合、ヒト起源の細胞であり、しかも、アルテミンがヒトのアルテミンであることが望ましい。ただし、本願に記載する配合物と方法は、獣医学的治療だけでなくヒトの治療にも応用することができ、本願で使用される用語「患者」とは、人間および動物の患者を含むことを意図している。

#### 【0100】

細胞は体外で増殖することが可能で、例えば患者への移植又はengraftmentに使用することができる(Muenchほか、Leuk & Lymph 16:1-11, 1994)。この発明の別の実施例では、移植又はengraftment用の細胞の体外増殖を促進させるため、アルテミンを使用することができる。現在方法では、エリスロポイエチン、コロニー刺激因子、幹細胞因子及びインターロイキンのような因子を含むバイオリアクタ培養システムを使用し、赤血球、単球、好中球、およびリンパ球のための造血先祖細胞を増大させた(Verfaillie, Stem Cells 12:466-476, 1994)。これらの幹細胞はヒトドナーの骨髓、または、ヒト末梢血液、へその緒の血球から単離することができる。増殖させた血液細胞は、特殊な病状の結果、または悪性疾

患治療のための大量投与化学療法の結果、これらの細胞が欠乏している患者の治療に使用される(George, Stem Cells 12(Suppl 1):249-255, 1994)。化学療法後の細胞移植の場合、化学療法の前に骨髓細胞を採取し、悪性細胞を取り除く機能を有する方法を使用して、体外で細胞を増殖させ、化学療法後に増殖させた細胞を患者に移植することによって、自系移植を行うことができる(詳細については、Rummel & Van Zant, J Hematotherapy 3: 213-218, 1994を参照のこと)。

#### 【0101】

また、神経系での前駆体細胞の体外増殖にも、GFR $\alpha$ 3の有無に関係なくアルテミンペを使用することができると考える。細胞の移植又はengraftmentは、現在、例えばパーキンソン氏病における場合と同様、ニューロンの一定の集団が変性のため失われる疾病の治療法として研究されている(Bjorklund, Curr Opin Neurobiol 2:683-689, 1992)。ニューロン前駆体細胞を動物、ヒトドナーまたはヒト胎児の組織から採取し、次いで、アルテミンを使用する培養で増やすことが可能である。またこれらの細胞は、患者に移植することができ、患者の体内で変性のため失われた細胞部分に代って機能する。ニューロトロフィンは、例えば、交感神経神経芽細胞のNT-3刺激などのニューロンの前駆体細胞の生存と増殖を刺激することが実証されているので(Birren他., Develop 119: 597-610, 1993)、アルテミンは、神経系の発達期間に同様の方法で機能し、ニューロン細胞の体外増殖に資する。

#### 【0102】

多くの病状において、患者のアルテミン又は溶解性GFR $\alpha$ 3のレベルを測定することが望ましい。アルテミン又はGFR $\alpha$ 3を固有に産出する量の変化は、特定の症状、特に神経変性症状及び疾患のような細胞変性においてある種の役割を果たす。他の神経栄養因子は疾病の間に変化することが知られている。例えば、多発性硬化症の場合、脳脊髄液におけるNGFタンパクのレベルは急性疾病の段階で増加する(Bracci-Laudiero et al., Neuroscience Lett 147:9-12, 1992)。さらに全身性紅斑性狼瘡の場合、炎症性のエピソードと、血清中のNGFレベルとの間には相関関係がある(Bracci-Laudiero et al., NeuroReport 4:563-565, 1993)。

## 【0103】

よって、アルテミンレベルの定量化により、臨床的に有用な情報を提供することができる。さらに、変性症状の治療では、アルテミンを含有する組成物が投与され、血清、脳脊髄液又は任意の所望の組織コンパートメント中のアルテミンの特定の目標レベルを達成させることがより望ましい。よって、患者のアルテミンレベルを監視することが望ましい。したがって、本発明は患者からのサンプル中のアルテミンの有無の検出方法を提供する。

## 【0104】

患者内のアルテミンの有無を検出するという関係で本願に使用される用語「検出」とは、患者内のアルテミンの量の算定又は患者内でアルテミンの量を発現する能力の検出、アルテミンをその他の成長因子から峻別すること、変性的疾病の起こり得る結果及び回復の見込みに関する予測の評価、病状の目安としての一定期間にわたるアルテミンレベルの監視、及び、患者のための好ましい治療的処方を決めるためのアルテミンレベルの監視が含まれる。

## 【0105】

患者内のアルテミンの存在を検出するため、患者からサンプルを採取する。サンプルは組織生検サンプルか、血液、プラズマ、血清、CDF等のサンプルである。アルテミン検出用サンプルはアルテミンを発現することが公知である任意の組織から採取されうる。末梢部分のアルテミンレベルを評価するとき、サンプルは血液、プラズマまたは血清のサンプル、又は生体組織サンプルであることが望ましい。中枢神経系のアルテミンレベルを評価するとき、望ましいサンプルは脳脊髄液から採取されるサンプルである。

## 【0106】

いくつかの例では、アルテミン遺伝子が患者体内で無傷であるか、患者体内の組織からセルラインにいるか否かを調査することが望ましい。「無傷の(intact)アルテミン遺伝子」とは、アルテミン産出物を変えるか、或いは、生物学的活性や安定性などが変え、疾病過程若しくは細胞変性病状の感染生じさせる点変異、欠失、挿入、染色体切断、染色体の配列換えその他の変化が遺伝子に起きていないことを意味する。逆に、「無傷ではない(non-intact)アルテミン遺伝子」とは、

かかる変化が起きていることを意味する。したがって、本発明の一の実施例では、アルテミン遺伝子のあらゆる変異を検出し、特徴付ける方法を提供する。この方法は、アルテミン cDNA、ゲノムDNA またはその断片と特にハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

#### 【0107】

典型的に、患者のゲノムDNAは患者から採取された細胞サンプルから単離され、例えばTaqIやAluIなどの一以上の制限エンドヌクレアーゼで消化される。本技術分野では周知技術であるサザンブロット法を用いて、本アッセイは、患者ないし患者の特定組織に、無傷なアルテミン遺伝子、又は、異常アルテミン遺伝子の存否を判定する。アルテミン遺伝子とのハイブリダイゼーションには、一本鎖DNAを採取するための染色体DNA変性が伴う。そのほかにも、アルテミン遺伝子配列に関連した遺伝子プローブと一本鎖のDNAの接触、さらに、少なくともヒトアルテミン遺伝子の一部を含有する染色体DNAを検出するハイブリダイズされたDNAプローブを確認する。

#### 【0108】

本願で使用される用語「プローブ」とは、プローブ配列が目的部位において配列と相補性があるため、目的配列とハイブリッド構造を形成するポリヌクレオチドからなる構造を指している。プローブはターゲット配列の正確な相補配列を有する必要はないが、検出されるべき鎖と選択的にハイブリダイズするのに十分に相補的でなければならない。選択的ハイブリダイゼーション又は特定ハイブリダイゼーションとは、ポリヌクレオチドがターゲットポリヌクレオチドと優先的にハイブリダイズすることを意味する。プローブとしての使用に適したオリゴマーは、最低約8 - 12個の隣接したヌクレオチドを有し、このヌクレオチドは目的(ターゲット)配列に対して相補性をもつ。好適には最低約15個又は17個のヌクレオチドを有する。ただし、約20個から25個のヌクレオチドのポリヌクレオチドプローブと、約100個以上のヌクレオチドまでのポリヌクレオチドプローブは、本発明の範囲内に包含される。

#### 【0109】

本発明のアルテミン遺伝子プローブは、DNA又はRNAオリゴヌクレオチド



であり、例えば、切除、転写または化学合成など従来公知のいずれの方法によっても生成することができる。プローブは、例えば放射性または蛍光性標識または酵素のマーカのような従来公知の任意の検出可能なラベルによって標識化される。プローブの標識化は、PCR、ランダムプライミング、末端標識化、ニック翻訳などの技術で知られるいずれかの方法によっても達成することができる。また、当業者であれば、ハイブリダイゼーションを決定するための標識化プローブを使わない他の方法を使用し得ることを理解している。ハイブリダイゼーションを検出するのに使用することができる方法の例には、サザンブロット法、蛍光in situ (インシチュ) ハイブリダイゼーション、及びPCR増幅による一本鎖の立体配座多型現象などがある。

#### 【0110】

ハイブリダイゼーションは、通常、25～45℃、好適には32～40℃、最も好適には37～38℃で実行される。ハイブリダイゼーションに必要な時間は約0.25～約96時間までで、より好適には約1～約72時間、最も好適には約4～約24時間までである。

#### 【0111】

アルテミン遺伝子異常は、PCR法を、又は、長い配列内のターゲット配列を同定するためのオリゴヌクレオチドと、アルテミン遺伝子内に側接触若しくは存在するプライマーを使用する任意の他の公知なDNA増幅法を、利用して検出され得る。PCR方法は周知技術である。簡潔に言えば、この方法は2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用して実行されるが、かかるオリゴヌクレオチドプライマーはアルテミン遺伝子内部に存在するターゲット配列に側接触し、ターゲット配列を増幅する核酸配列とハイブリッド形成させ得る。本願にて使用される用語「オリゴヌクレオチドプライマー」とは、約8～約30個の塩基の長さ、通常有するDNA又はRNAの短い鎖を指す。上流および下流プライマーは、長さで最低約15のヌクレオチドから約20のヌクレオチドであることが好ましく、約30のヌクレオチド又はそれ以上であることが好ましい。そのプライマーは側接触領域にハイブリッド形成をしてヌクレオチド配列を複製する。重合は、二重鎖のDNA分子を産出するため、デオキシヌクレオチド三リン酸塩若しくはヌ

クレオチド類似体の存在下で、DNAポリメラーゼによる触媒作用を受ける。次いで、二重鎖は、物理的、化学的または酵素の作用を利用する変性法により分離される。一般的に、物理的変性法では通常約80℃～105℃で約1分～約10分間核酸の加熱を行う。この過程は必要なサイクル数だけ繰り返される。

#### 【0112】

プライマーは増幅されるDNA鎖に実質的に相補的であるように選択される。したがって、プライマーは、鋳型の正確な配列を反映する必要はないが、増幅される鎖と選択的にハイブリダイズする、又は特定ハイブリダイズするために十分に相補的でなければならない。選択的ハイブリダイゼーション又は特定ハイブリダイゼーションとは、ポリヌクレオチドがターゲットポリヌクレオチドと優先的にハイブリダイズすることを意味する。

#### 【0113】

PCR増幅の後に、アルテミンをコードするヌクレオチド配列又はその断片を有するDNA配列は、直ちに配列決定され、活性若しくは発現レベル等を変える可能性がある変異を確認するため、本願で開示した配列と比較分析される。

#### 【0114】

別の実施例として、アルテミンの検出法を提供し、これはアルテミン遺伝子を発現する組織の分析を根拠としている。同方法では、通常アルテミン遺伝子を発現する組織のサンプルからの、又はサンプルのmRNAから産出されたcDNAにからの、mRNAとポリヌクレオチドプローブをハイブリッド形成される。サンプルは、アルテミン遺伝子に異常を有すると疑われている患者から、或いは、アルテミン遺伝子に異常を持つと疑われる特定患者の組織または細胞類型から入手される。

#### 【0115】

アルテミントタンパク質をコードするmRNAの存在を検出するため、患者からサンプルを採取する。サンプルは血液または組織生検サンプルからも得られる。サンプルはそこに含まれるmRNAを抽出するため処理してもよい。サンプルから採取されたmRNAはゲル電気泳動又は他のサイズ分離器にかけられる。

#### 【0116】

サンプルのmRNAを、ハイブリッド二重螺旋を形成するプローブとして機能する核酸と接触させる。上記の標識プローブの使用によって、生成する二重螺旋の検出が可能になる。

#### 【0117】

非アルテミンヌクレオチド配列へのハイブリダイゼーションでは、偽陽性を防ぐために、高度なストリジェンシー条件を利用し得る。アルテミンをコードするポリヌクレオチド又はその断片と完全に相補的ではない配列を利用するときは、それほどストリジェントでない条件は利用され得るが、偽陽性の蓋然性が高いため、あまり好ましい手法ではない。ハイブリダイゼーションのストリジェンシーはハイブリダイゼーション及び洗浄過程における数多の要素で決定される。例えば、温度、イオン濃度、時間の長さおよびホルムアミドの濃度などである。これらの要素は例えば、Sambrook他で概説されている（上記、Sambrook他、1989）。

#### 【0118】

アルテミンタンパクをコードするmRNAのサンプルの検出感度を増大させるため、逆転写過程／重合連鎖反応(RT/PCR)の技法を使用して、アルテミンタンパクをコードするmRNAから転写されるcDNAを増幅させることができる。RT/PCR法は本技術では周知な技法である。

#### 【0119】

あるいは、逆転写cDNAのアルテミンターゲット配列が増幅され、リガーゼ連鎖反応法のような他の任意な方法を利用して検出される。例えば、ギャップPCR (G-PCR) 及び他の変形法、若しくは自己維持配列複製 (3SR) やそのさまざまな変形法などがある。その他に、アルテミンmRNAは非対称ギャップPCR (AG-PCR) により直接的に検出され得る。例えば、Leckie他、「Infection Disease Testing by Ligase Chain Reaction」 in Molecular Biology and Biotechnology, R. A. Myers編集、pp. 463 - 466、VCH発行所、1995を参照するとよい。

#### 【0120】

本発明はさらに、患者から採取されるサンプル中のアルテミンタンパクの存在を検出する方法を提供する。従来技術で公知のタンパク検出方法のいずれも使用

することができる。かかる方法には、以下のものに限定されないが、免疫拡散法、免疫電気泳動、免疫化学法、バインダー-リガンドアッセイ、免疫組織化学法、凝集および補体アッセイなどがある（例として、Basic and Clinical Immunology, Sites and Terr, eds., Appleton & Lange, Norwalk, Conn. pp 217-262, 1991を参照するとよい）。好適なのは、バインダー-リガンド免疫検定法であり、この方法は、アルテミンタンパクのエピトープ又はエピトープ類と抗体を反応させ、次いで、アルテミンタンパクを競合的に置き換えることを含む。

### 【0121】

多数の競合的・非競合的タンパク結合免疫アッセイ法は、本技術分野において周知である。かかるアッセイで用いられる抗体は、例えば凝集テストでの使用のために標識化されない場合や、様々なアッセイ法での使用のために標識化されることもある。使用できる標識として、例えば、放射性核種、酵素、フルオレッセー（fluorescers）（蛍光剤）、ケミルミネッセー（chemiluminescers）（化学発光剤）、酵素基質、補因子、酵素抑制剤、粒子、染料などがあり、ラジオ免疫アッセイ（RIA）法、酵素免疫アッセイ法（例：酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）法）、蛍光免疫検定などを用いて標識化される。

### 【0122】

従来技術において任意の周知な方法によっても、アルテミンタンパク及びそのエピトープへのポリクローナル若しくはモノクローナル抗体が、免疫アッセイ法に使用することができる。「エピトープ」とは、ポリペプチドの抗原決定因子のことである。用語「エピトープ」には、アルテミン特異B細胞エピトープ又はTヘルパー細胞エピトープをも含む。1個のエピトープは、エピトープ特有の空間立体配座の中の3個のアミノ酸によって構成される。一般に、エピトープは少なくとも6個のかかるアミノ酸から成る。アミノ酸の空間立体配座を決定する方法には、従来技術で周知であり、例えば、エックス線結晶学と二次元核磁気共鳴などがある。

### 【0123】

タンパクに対応する抗体を調製する1つの方法には、配列を化学的に合成して、その合成した配列を通常、ウサギかマウスなどの適切な動物に注入し、タンパ

クのすべてまたは一部のアミノ酸配列を選択、調製することが含まれる（例10を参照）。

#### 【0124】

疎水性領域に存在するオリゴペプチドに基づくアルテミンタンパク質に対応する抗体産出のための候補として、オリゴヌクレオチドが選択され、よって成熟タンパク質において晒される蓋然性が高い。

#### 【0125】

アルテミンに対する抗体は、抗体が他のファミリーメンバーと交差反応し得るように、本願で識別された一以上の保存的領域を含むオリゴペプチドに対しても育成され得る。かかる抗体は他のファミリーメンバーの確認や単離に使用することができる。

#### 【0126】

アルテミンタンパクまたはそのエピトープの調製方法には、以下のものに限定されないが、化学合成、組換えDNA技法または生物サンプルからの単離その他がある。例えば、固相ペプチドの化学合成は、古典的なメリーフィールド法(Merrifield, J Am Chem Soc 85:2149, 1963)、または迅速自動化複合ペプチド合成装置を用いたFMOC法などで行うことができる(DuPont Company, Wilmington, DE) (Caprino and Han, J Org Chem 37:3404, 1972)。

#### 【0127】

ポリクローナル抗体は、ウサギか他の動物に抗原を注入し、続いて適切な間隔をおいてブースター注入を行うことにより免疫性を与えて調製できる。その方法は、通常、ELISAまたはバイオアッセイを用いて、動物から採取された血清のアッセイを精製アルテミンタンパク質に対して行う。これはニューロンまたは他の細胞に及ぶアルテミンの作用をブロックする能力に基づくものである。鳥類、例えば、にわとり、七面鳥などを使用するときには、卵の卵黄から抗体を単離できる。モノクローナル抗体の調製はMilsteinとKohlerの方法にしたがって行うことができる。これは骨髄腫やリンパ腫細胞などの腫瘍細胞を絶え間なく複製することによって免疫マウス脾細胞を融合させる方法である。(Milstein and Kohler Nature 256:495-497, 1975; Gutfre and Milstein, Methods in Enzymology

: Immunochemical Techniques 73:1-46, Langone and Banatis eds., Academic Press, 1981)。次いで、こうして形成されたハイブリドーマ細胞のクローン化を行う。その方法には、E L I S A、R I A、バイオアッセイなどで生成された抗体をアッセイする限界希釈法やスーパーネート (supernates) がある。

#### 【0128】

ターゲットタンパクを認識し、特定結合する抗体の固有な能力によって、タンパク質の過剰発現を処置する方法が得られる。したがって、本発明の別の態様では、アルテミンタンパクの過剰発現が関与する疾病を、アルテミンタンパクに対して特異的抗体をもつ患者の予防及び治療方法を提供することである。

#### 【0129】

アルテミンタンパク質に特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体などの特異抗体は、本技術で知られる既述の適切な方法によって産出させることができる。例えば、ネズミまたはヒトモノクローナル抗体はハイブリドーマ技術によって産出させることができる。あるいは、アルテミンタンパク質、その断片で免疫学的に活性のあるもの、抗イデオティピック (idiotypic) 抗体、その断片などを動物に投与することにより、アルテミンタンパク質を識別でき、それに結合できる抗体の産出を惹起する方法もある。かかる抗体は任意のクラスの抗体から得られ、以下のものに限定されないが、例としてIgG、IgA、IgM、IgD、IgE 他があり、鳥類の場合、IgY および抗体の任意のサブクラスからも得られる。

#### 【0130】

本発明の好適な実施例は以下に続く例に記述される。請求の範囲に含まれるその他の実施例は、本願で開示された明細書又は本発明の実施例を検討することにより、当業者には明らかになる。本明細書並びに以下の例の記載の意図は、請求の範囲に示された本発明の範囲及び精神に関する例示に過ぎない。

#### 【0131】

##### 例 1

本例は、ヒト及びマウスアルテミンをコードするポリヌクレオチドの確認及びクローニングを例示する。

#### 【0132】

アルテミンは、全長マウスプレ-プロ-ニュールツリンアミノ酸配列(195個のアミノ酸)を利用して発見され、ハイスルーブットゲノムシーケンス(h t g s)データベースをスキャンさせた。そのデータベースはデフォルトパラメータを利用して、BLAST 2.05プログラムのt b l a s t n特徴を利用してサーチした(Altschul他、Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997)。このサーチにより二つのヒトパセリウム人工染色体(BAC)クローン、AC005038(NH0486122)及びAC005051(RG037F03)を確認し、マウスプレ-プロ-ニュールツリンと整列させると有意な相同性スコアを有する。疑問に思い、成熟ヒトニュールツリン配列を利用してBLASTサーチを繰り返すと、同じ二つのBACクローンが確認された。上記の二つのBACクローン配列を利用して、二つのEST(Expressed Sequence Tags)も、デフォルトパラメータを利用したBLAST2.05プログラムのb l a s t n特徴を用いて、ESTデータベースにて確認された。上記ESTは、肺カルシノーマ由来のAA931637(o o 3 5 c 1 2)と、前立腺カルシノーマ由来のAA533512(n j 9 6 b 1 1)であった。上記アライメントの解析から、特徴のないh t g s配列部分は、おそらく、GDNF-ニュールツリン-ペルセフィンファミリーの新規メンバーを表わすことを明らかにした。もっとも、実際に、h g t s配列は、後に発見された数多くの配列エラー、つまり、省略、付加及び不正確な塩基を有し、BACクローンの一方のクローンであるAC005038は、197のヌクレオチド(ヌクレオチド67, 464から67, 660)ストレッチを有し、最終的にはアルテミン核酸の相補的鎖のヌクレオチド663から467と同一であると判明し(図1Bを参照)、他方のクローンであるAC005051は、アルテミン核酸(図1Bを参照)の相補的鎖と同一である183のヌクレオチド(ヌクレオチド113, 379から113, 561)のストレッチを有していた。

### 【0133】

一般に、h g t sデータベースの配列は多くの配列誤差を含んでいることは公知であるので、オリゴヌクレオチドプライマーがヒトゲノムDNAからの本新規な成長因子の遺伝子の断片を入手するために、二つのh t g sエントリの配列が

ら設計された。プライマーは予測された新規な成長因子の部分にコードする略708nt断片を増幅するように設計され、タンパク質の成熟領域を介して、プロドメイン内から3'末翻訳領域内の端部へ延長した。ヒトゲノムDNAはフォワードプライマーM4206 [5'-TGGCCGCTCTGCTGAGCA-3' (配列番号(SEQ ID NO)20)]と、リバースプライマーM4205 [5'-CGATCATCTAGACCAACCGGTAAGGGTCCAGTCTGGAA-3' (配列番号(SEQ ID NO)21)]とを利用するPCR反応でのテンプレートとして利用した。PCR反応は、95℃5分間の初期の変性、次いで、95℃で15秒、60℃で30秒、68℃で80秒の30サイクルの条件で、添加剤(1.5Mベタイン/1.5%DMSO:最終濃度)のあるKlentaq緩衝液のKlentaqを用いて実行した。増幅産物をT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理し、端部を大腸菌DNAポリメラーゼI(Klenow断片)で平滑し(blunt)、EcoRV消化BSKSプラスミドへクローン化させた。生じたクローンのヌクレオチド配列を得た。

### 【0134】

さらなる重複断片もヒトゲノムDNAから増幅され、成熟領域の開始から停止コドンへ延長する。これはフォワードプライマーM4207 [5'-TACAAGGACGATGACGATAAGGGGGCGCGGGGCTGCGGCC TGCGCTCGCAGCTG-3' (配列番号(SEQ ID NO)22)]と、リバースプライマーM4205 [5'-CGATCATCTAGACCAACCGGTAAGGGTCCAGTCTGGAA-3' (配列番号(SEQ ID NO)23)]とを利用するPCR反応でのテンプレートとして利用した。PCR反応は、95℃5分間の初期の変性、次いで、95℃で15秒、60℃で30秒、68℃で80秒の30サイクルの条件で、添加剤(5%DMSO:最終濃度)のあるKlentaq緩衝液のKlentaqを用いて実行した。増幅産物をT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理し、端部を大腸菌DNAポリメラーゼI(Klenow断片)で平滑し、EcoRV消化BSKSプラスミドへクローン化させた。生じたクローンのヌクレオチド配列を得た。

### 【0135】



上記断片からの配列と h t g s データベースにエントリ配列とは、Seqman プログラム (DNA STAR 社) を利用して組立てられた。図 1 A に示す組立ヌクレオチド配列は、プロ - ドメイン内から延長する部分的プロ - アルテミンアミノ酸配列をコードし、3つの潜在的 R X X R 開裂部位を含み、次いで、成熟アルテミンポリペプチドに対応する領域を有し、図 2 A に示す成熟 G D N F、ニューロツリン及びベルセフィンと相同である。

#### 【0136】

また、上記配列から設計されたプライマーを利用してマウスアルテミン遺伝子に相当するマウスゲノム DNA の断片を増幅させた。このマウス DNA 断片を利用してマウス B A C ゲノムライブラリーをスクリーニングし、マウスアルテミン遺伝子を含有する B A C クローンを選定した (データは示さず)。

#### 【0137】

c DNA 端部 (R A C E) P C R の迅速な増幅を実行するために、ヒト及びマウスアルテミンゲノム配列からプライマーを作出し、数多の組織ライブラリーからアルテミン c DNA の 5' 端部を入手した。P C R 断片を前記した E c o R V 消化 B S K S へ平滑 - クローン化し、全体の配列を決定した。ヒト R A C E 産物は、脳下垂体、胎盤及び腎臓から調製した M A R A T H O N R A C E c D N A ライブラリー (C L O N T E C H 社製) から入手した。マウス R A C E 産物は、生後 18 日 (E 18) のマウス M A R A T H O N R A C E ライブラリーから入手した。ゲノム DNA 及び c DNA からのクローン化された O C R 断片の完全な二重鎖配列解析を行い、ヒト及びマウス c DNA のコンティグを生じさせた。各 P C R 断片の少なくとも二つの独立したクローンの配列を決定した。マウス B A C クローン制限断片 (p B l u e s c r i p t へサブクローン化させた) のゲノム配列と、ヒト B A C クローン部分由来の配列とを利用して、図 1 B (ヒト) 及び図 1 C (マウス) に示す c DNA 配列を確認した。

#### 【0138】

c DNA のイントロン位置及びスプライシングは、両イントロンと交差するヒト及びマウス c DNA ライブラリーからの配列決定 P C R 増幅断片により確認した。図 2 C に例示するように、アルテミン遺伝子は二つのイントロンを有する。

第一のイントロンの別のスプライシングにより産出した第二のスタートメチオニン (Met<sup>\*</sup>) を含有する cDNA も、あるヒト cDNA ライブラリーからの RACE-PCR により同定した。ただし、同様なメッセージはマウスでは確認されなかった。マウスゲノム配列は同位置にメチオニンを有しない。ヒトメッセージのいずれかから発生した成熟アルテミンタンパク質は同一であった。

### 【0139】

アルテミンをコードする BAC クローンに存在するマーカの解析から、ヒトアルテミン遺伝子は染色体 1p32-33 に位置し、マーカー D1S190-アルテミン-D1S211 (テロメリックからセントメリック) により側接触していることが示された。

### 【0140】

アルテミン遺伝子を有するヒト DNA 配列を図 14 に示し、テンプレートとしてのヒトゲノム DNA を利用した多くの独立してクローン化させた PCT 産出物からの配列と、ヒト BAC クローン配列とから集めた。配列の開始は BAC クローン AC005051 の nt 11472 と、前記した hgt s データベースからの BAC クローン AC005038 の nt 68862 とに相当する。

### 【0141】

図 15 に示すラットアルテミン cDNA 断片は、以下のプライマーによるテンプレートとしてのラットシュワン (Schwan) 細胞 cDNA ライブラリーから PCT を利用して発生させた：フォワードプライマー 5' - CCGGTGAGCGCTCTCGGCCT - 3' (配列番号 (SEQ ID NO) 76) とリバースプライマー 5' - TTCTGGATTCTCCAGAGGAGTTTC - 3' (配列番号 (SEQ ID NO) 77)。PCT 条件は以下のようであった：95℃2 分間、次いで、95℃10 秒間、60℃30 秒間、72℃30 秒間と 72℃で 5 分間の 30 サイクルであった。

### 【0142】

## 例 2

本例は、さまざまなヒト組織におけるアルテミンの発現を説明する。

### 【0143】

大人及び生後のヒト組織におけるアルテミン発現の初期の研究として、ポリ(A) RNAの正規化サンプルを含有するヒトマスターRNAプロット(MRB)(CLONTECH社製)は、ヒトアルテミンcDNAのランダムヘキサマー<sup>3</sup> P-標識化断片でプローブされ、シグナルはPhosphorImager(モレキュラダイナミクス社製)を用いて視覚化させた。結果を図5Aに掲載する。

#### 【0144】

相対的に低レベルの発現が多くの大人の組織で観測され、最も高レベルは脳下垂体、胎盤及び気管であった。ヒト胎児組織間では、腎臓及び肺が最も高レベルの発現を示した。大人及び胎児の脳では、殆どのシグナルが可視化されたが、アルテミンmRNAの低レベルの発現は大人の基底核の構造(視床下部、核小体、果核、黒質)と、大人の視床で観測され、アルテミンは皮質下運動システムに影響を及ぼすことが示唆された。また、発現は脊髄でも観測されたが、本組織からのRNA調製はDRG材料だけでなく脊髄をも有し、観測された発現に寄与している蓋然性が高い(図6を参照)。

#### 【0145】

胚形成中のアルテミン発現を正確に局在化させるために、ラットアルテミンcDNAの断片をPCRを利用して発生させ、pBluescriptへクローン化させた。センス及びアンチセンス<sup>3,3</sup> P-標識化RNAプローブをクローン化させたラットアルテミンcDNA断片から発生させ、前記したようにフレッシュ凍結させた生後14日(E14)のラット胚のアルテミンmRNA発現のインシチュハイブリダイゼーション解析に利用した(Araki他、Neuron 17: 353-361, 1998)。結果を図6A及び図6Bに掲載する。

#### 【0146】

胚形成時期の脳若しくは脊髄索にはシグナルは全く観測されなかった。最も著しい発現は神経根で観測されたが、背根神経節(DRG)のニューロンを育成させなかった(図6A)。さらに、重要な拡散発現も、上腸間膜動脈を囲みながら観測され、動脈自体の細胞による取囲み間充織又は発現のいずれかに相当する(図6B)。上記データから、アルテミンは上腸間膜動脈も自己神経支配の目的由来の因子として、又はDRGの知覚ニューロンの成長用パラクリン法で、抹消ニ

ユーロンの生存/栄養因子として作用する蓋然性が示唆される。興味深いことに、潜在的GFR $\alpha$ レセプター間で、アルテミンの発現は抹消神経節にて高レベルに発現するがインシチュハイブリダイゼーションによるCNS成長にて検出可能ではない発現であるオーファンGFR $\alpha$ 3のそれと最も相補的である(Baloh他、1998、前掲; Trupp他、Mol. Cell. Neurosci., 11: 47-63, 1998; Widenfalk他、Eur. J. Neurosci. 10: 1508-1517, 1998; Worby他、J. Biol. Chem. 271, 23619-23622, 1998)。任意の組織サンプルでのセンサプローブを利用してシグナルは検出されなかった。

#### 【0147】

E14での成長神経根におけるアルテミンの発現により、シュワン細胞前駆体又は非成熟シュワン細胞により産出されることを示唆する。シュワン細胞がアルテミンを発現するか否かを調査するために、半定量的RT-PCR解析を早期の出産後ラットから単離されたシュワン細胞の一次培養から、大人の坐骨神経からの有髄シュワン細胞から、神経横断から16時間後、3日後又は7日後の坐骨神経の抹消セグメントから単離されたシュワン細胞から、調製されたcDNAライブラリーにて実行した。早期の生後ラット由来の生成シュワン細胞の培養は、Brookes他、Brain Res. 165: 105-118, 1979により説明したように実行した。大人のラットの坐骨神経横断及び逆転写cDNAの発生は、別に記載されたように実行した(Araki他、前掲; Baloh他、Neuron 18: 793-802, 1997)。ライブラリーからのcDNAサンプルをグリセロアルデヒド3-ホスホデヒドロゲナーゼ(GAPDH)のレベルで正規化し、フォーワードプライマー5'-TCCGCAACGGTGGCTCACCGGTCTT-3' (配列番号(SEQ ID NO): 66) とリバースプライマー5'-GCACGAGCCGCTGCAGAAAGCGGA A-3' (配列番号(SEQ ID NO): 67) とを利用し、以下の条件で増幅させた: 95℃2分間に続き、95℃の20秒間、54℃の30秒間、72℃の30秒間の36サイクルとm次いで、最後に72℃で2分間のインキュベーションを行った。産出物を3%アガロースゲルにて分離し、臭化エチジウムで染色した。

#### 【0148】

図6Cに示すように、アルテミンは大人の坐骨神経(N)の成熟有髄シュワン

細胞 (P S) よりも、培養中の未成熟シュワン細胞において高レベルで発現される。しかしながら、アルテミン発現は坐骨横断後の抹消神経セグメントにてアップレギュレートされ、シュワン細胞は軸索再生を支援する未成熟状態を要するパラダイムである (Scherer, Curr. Opin Neurol. 10: 386 - 397, 1997を参照)。上記データは、シュワン細胞はアルテミンを産出し、さらに、アルテミン発現は抹消ニューロンの成長及び再生に影響を及ぼすように、適切に調節されることを明らかにしている。

#### 【0149】

#### 例 3

本例は、組換えアルテミンタンパク質の産出を例示する。

#### 【0150】

Nde I 部位と 5' 端部の 8 - ヒスチジン tag と、3' 端部に Kpn I 部位とを有する、成熟非とアルテミンをコードする配列 (図 3 A) に相当する PCR 断片を作成し、次いで、pET30a (+) バクテリア発現ベクタ (Novagen社製) の対応する部位に直接クローン化させた。アルテミンをコードする発現ベクタを大腸菌菌株 BL21 へ形質転換させ、組換えヒトアルテミンタンパク質を産出させ、ニュールツリンで説明したように精製した (Creedon 他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7018 - 7023, 1997)。

#### 【0151】

#### 例 4

本例は、アルテミンはインビトロの抹消ニューロンの生存を促進することを例示する。

#### 【0152】

前記したように、アルテミンの発現により、GDNF 及びニュールツリンと同様に、成長抹消ニューロンに影響を及ぼすことが示唆される。インビトロでのさまざまな抹消ニューロン集団の生存を支援するアルテミンの能力を評価するために、生後 1 日 (P1) の SD ラット (インディアナ州のあるハーレンスブラウジ - ダーレイ社製) 由来の背根、三叉、結節性、上けい神経節 (SCG) からのニューロンを、アルテミン、GDNF、ニュールツリン又はペルセフィンの存在下

で培養させた。各GDNFリガンドファミリーメンバーはヒト成熟アミノ酸配列からなり、標準的な組換えDNA法により産出させた。組換えGDNF、ニューロツリン及びペルセフィン、ジーンテック社製から購入したが、組換えアルテミンは例3に説明した方法で産出させた。

### 【0153】

以下に記載の標準的な方法を利用して、培養を行った(Kotzbauer他、Neuron 12: 763 - 773, 1994; Kotzbauer他、Nature 384: 467 - 470, 1996; Mibrandt他、Neuron 20: 245 - 253, 1998)。簡潔に言えば、SCGニューロンでは、解剖及び解離後、ニューロンをコラーゲン塗布した24のウェル組織培養プレートに設置させ、NGF含有場位置(AM50)に5日間維持し、その後、AM50に維持する、又は中和アンチNGF抗体プラスGDNF、ニューロツリン、ペルセフィン、アルテミン(特に断らない限り、50 ng/ml)を含む又は成長因子を含まない培地へ移動させた。培養を3日間継続し、その後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、トルイジンブルーで染色し、生存ニューロンを計算した。結節性神経節及び背根神経節ニューロン培養では、解離ニューロンをNGFに直接プレートに載せ(背根神経節)、BDNFに直接プレートに載せ(100 ng/mlの結節性神経節)、又は血清含有培地(アンチ-NGF抗体のあるAM50)のGDNFリガンドの一つに直接プレートし、培養中の3日後の細胞生存を前記のように算出した。三叉神経節を解剖し、解離し、NGF含有培地または指摘したGDNFリガンドに直接プレートし、生存細胞数をインビトロにて3日後に評価した。すべての培養系では、2乃至3の独立の実験を行った。結果を図7Aから図7Eに示す。

### 【0154】

GDNF及びニューロツリン(NTN)と同様に、アルテミン(ART)は背根神経節(DRG)と三叉神経節(TG)双方からの感覚ニューロンのサブセットの生存を支援したのに対し、ペルセフィン(PSP)は支援しなかった(図7A及び図7C)。興味深いことに、感覚ニューロンの上記の集団の双方では、ARTはGDNFやニューロツリンよりも莫大な数のニューロンを支援し、NGFと類似(DRG)、又はより多くの数のニューロンを支援した。DRGニューロ

ンに及ぼすアルテミン生存促進効果の用量応答解析から、 $EC_{50}$  は  $1 \sim 3 \text{ ng} / \text{ml}$ 、約  $10^{-10} \text{ M}$  であることが明らかとなった。

#### 【0155】

神経栄養BDNF (Lindsay他、1985) に応答する数多くのニューロンからなる結節性神経節の内臓感覚ニューロンに関して、アルテミン、GDNF及びニューロツリンは同数のNGニューロンを支援し、各因子はBDNF (図7D) と同等又それ以上の生存促進をもたらした。上記結果は以前に報告したものと同様であった (Kotzbauer他、1996、前掲; Trupp他、1995、前掲)。

#### 【0156】

また、アルテミンは培養中のSCGニューロンの生存を支援した (図7E)。もっとも、数少ないニューロンがGDNF若しくはニューロツリンよりもアルテミンにより支援された。前記のように調査した感覚ニューロンとは対照的に、GDNFファミリーリガンドはNGFと同様にニューロンを支援しなかった。したがって、GDNF及びニューロツリンと同様で、且つ、その胚発現パターンと一致して、アルテミンは培養中の感覚及び交感抹消ニューロンに対しては生存因子である。

#### 【0157】

### 例 5

本例は、RET発現ニューロブラストーマセルラインがアルテミンに応答することを例示する。

#### 【0158】

ニューロブラストーマセルラインは、GDNF及びニューロツリンに応答し、多様なGFR $\alpha$ /RETレセプタプロファイルを示す抹消交感ニューロブラスト腫瘍の誘導体である (Hishiki他、Cancer Res. 58: 2158 - 2165, 1998; Tansey他、投稿済)。数多の上記ニューロンセルラインに影響を及ぼすアルテミン能力を調査して、応答細胞が一致したレセプタプロファイルを有するか否かを求めた。

#### 【0159】

ある実験では、SH-SY5Yニューロブラストーマセルライン由来の細胞を

12のウェル組織培養プレートの $2 \times 10^5$ 細胞/ml/ウェルに載置させた。培養中の1日後、細胞を未処置(Cn)又は $50 \text{ ng/ml}$ のアルテミン(ART)又は $10 \mu\text{M}$ のレチノイン酸(RA)、SH-SY5Y細胞の分化の既知のインデュースで刺激を与えた。因子添加3日後、分化を評価し、細胞を写真に撮影した。図8Aから図8Cに示すように、アルテミン及びレチノイン酸は、その丈夫な神経突起生長及びニューロン形態により指摘されたSH-SY5Yセルラインにおける強い分化応答を誘発した。

#### 【0160】

別の実験では、NBL-Sニューロプラストーマセルラインの増殖を誘発するアルテミン能力を調査した。NBL-S細胞を、処置せずに、又は $50 \text{ ng/ml}$ のGDNF、アルテミン若しくはベルセフィン存在下で、標準培地中の48のウェルプレートに $5 \times 10^4$ 細胞/ウェルで載置させた。因子添加後にDNA合成を30時間行つて積極的に分割した細胞を、製造者インストラクションに従つてBrdU(カリメトリック)細胞増殖アッセイキットを利用して検出し、データを図8Dに掲載する。GDNFと同様に、アルテミンはNBL0S細胞の増殖を刺激するのに対し、ベルセフィンは刺激しなかった。

#### 【0161】

RETがアルテミンレセプタの必要な成分であることを確認するために、RETを発現しないニューロプラストーマセルラインCHP126、CHP134及びSANの応答性を検査した。上記セルラインはGDNF、ニューロツリン又はアルテミンには応答しなかった(データを示さず)。SH-SY5YおよびNBL-Sセルラインの双方はGFR $\alpha$ 1、GDR $\alpha$ 2及びGFR $\alpha$ 3だけでなくRETを発現し、上記実験ではアルテミンによる特定のコレセプタの使用を示唆しなかった。

#### 【0162】

#### 例 6

本例は、アルテミンがドーパミン作動性ニューロンの生存を支援することを例示する。

#### 【0163】



前記したように、アルテミン発現は調査した時期の生後のラットの脳及び脊髄索では観測されず、胎児ヒト脳でも観測されなかったが、ある大人の脳領域には非常に低レベル存在した。したがって、ラット胚腹側中脳からのドーパミン作動性ニューロンに影響を及ぼすアルテミン能力は、他のGDNFリガンドファミリーメンバーの生存促進活性と比較した。

#### 【0164】

生後14後の腹側中脳培養を、全体の中脳を冷ライボッツL15+6mg/mlグルコースへ排し、氷上に維持しながら組織を切り裂いて調製した。解剖に続き、組織をディスパーゼ（シグマ社製、1mg/ml）とコラーゲナーゼ（ウォーシングトンバイオケミカル社製、1mg/ml）の混合物中で消化した。次いで、組織を改質N2培地で2回洗浄し、35回粉碎した。細胞密度及び生存度を血球計を利用して評価し、細胞を排除するトリパンブルーを算出した。細胞を、DME/HamF12（1:1）と、1mg/mlのBSAと、5μMのインシュリンと、10nMのプロゲステロンと、100μMのブレッシンと、30nMのセレンと、10ng/mlのラットトランスフェリンと、100U/mlのペニシリンと、100U/mlのストレプトマイシンとからなる血清フリー培地にて、（125ng/mlポリ-D-リシンと25ng/mlラミニンとで塗布した）8のウェルチャンバースライドの20,000細胞/ウェルで載置させた。プレート中の15分間以内に因子を添加した。培養3日後、細胞を固定し、チロシンヒドロキシラーゼに対して染色し、チロシンヒドロキシラーゼ染色（TH+）ニューロンの数を計算した。二つの独立した実験からの結果を図7Fに示し、対照に対する生存TH+ニューロンの割合を表示する。

#### 【0165】

興味深いことに、アルテミンはドーパミン作動性中脳ニューロンの生存を支援した。もっとも、その時期の腹側中脳ではアルテミンの明確な発現はなかった。したがって、アルテミンは中枢だけでなく抹消ニューロンの生存も促進し、アルテミンのレセプタが上記の集団双方に存在することを明らかにした。

#### 【0166】

要約すると、抹消及び中枢ニューロン、及び神経セルラインのアルテミンのす

べての生物学的応答から、アルテミンはGDNF及びニューロツリンと同様若しくは重複するレセプタ成分を利用することが示唆される。

# 【0167】

## 例 7

本例は、アルテミンがコレセプタとしての先のオーファンレセプタGFR $\alpha$ 3を利用して、RETを介してシグナルを送ることを例示する。

# 【0168】

アルテミン、GDNF及びニューロツリンは抹消及び中枢神経集団に対して類似の活性プロファイルを示し、しかもアルテミン活性はニューロプラストーマセルライン中のRET発現と相関しているので、一次培養SCGニューロンの、及びアルテミン応答ニューロプラストーマセルラインNBL-SのRETを活性化させるアルテミン能力を、Retリン酸化及び前記したMAPKキナーゼ活性化のウェスタンブロットを実行することにより調査した(Baloh他、1997、前掲; Crendon他、1997、前掲)。

# 【0169】

簡単に説明すると、SCGニューロンは生後1日(P1)ラットから解剖し、5日間NGF含有培地にて維持し、その後、アンチ-NGF抗体の存在下でのNGFフリー培地へ移動させることによりNGFを排した。NGFなしで2時間後、ニューロンをNGF、GDNF又は50ng/mlのアルテミンを含有する培地へ20分間移動させた。細胞を冷PBSで洗浄し、免疫沈澱緩衝液(pH7.4の10mMTris中の1mMのEDTA/1mlのEGTA/0.2mMのNaVO<sub>3</sub>/1mMのPefabloc/1 $\mu$ MのペプスタインA/10 $\mu$ g/mlのロイペプチン/2 $\mu$ g/mlのアプロチニン/1%TritonX-100/0.5%のNonidetP-40/150mMのNaCl)で収集した。溶解物を30 $\mu$ lアガロース結合アンチ-ホスホチロシン抗体(カルバイオケム社製)で、1時間4℃にてインキュベートさせた。次いで、ビーズを免疫沈澱緩衝液で3回洗浄し、SDSサンプル緩衝液中で再懸濁させ、5分間沸騰させた。サンプルをSDS-PAGEを利用して分離し、ニトロセルロース膜へ移動させた。膜を、5%乾燥ミルクを含有するTBS中で、1時間25℃でブロックし、アンチ-Ret抗体の

1:300希釈で4℃で一晩インキュベートさせ、次いで(0.1%Tween-20を含有するTBSで3回)洗浄し、HRP(ジャクソンイムノリサーチ社製)に結合したアンチ-ラビット抗体の1:10,000希釈中でインキュベートさせた。膜を3回洗浄し、SuperSignal ULTRA(ピース社製)で5分間インキュベートさせ、その後、フィルムに晒した。MAPキナーゼ(MAPK)アッセイでは、全体の溶解物ウォー(lysate wars)の一部を免疫沈澱前に除し、SDS-PAGEにより分離し、アンチ-ホスホ-MAPキナーゼ抗体(ニューイングランドバイオラボ社製)を利用して、免疫プロットした。

### 【0170】

NBL-S細胞を6ウェルプレートに $3 \times 10^6$ 細胞/ウェルに載置させ、46時間後に低血清(0.5%)培地へ2時間移動させ、次いで、20分間NGF、GDNF又はアルテミン(50 ng/ml)で刺激を与えた。その後、細胞を収集し、前記のように解析した。PI-PLC処置では、NBL-S細胞のパレットの組を前記のように載置させたが、500 mU/mlのPI-PLC(ペーリンガー-マンハイム社製)で1時間処理し、PBSで洗浄し、前記因子で刺激を与えた。

### 【0171】

結果を図9A及び図9Bに示す。GDNFと同様に、アルテミンはSCGニューロン及びNBL-SセルラインのRETのチロシン-リン酸化を誘発し、この活性化はMAPキナーゼ経路の活性化により測定されたダウンストリームシグナリングを惹起させるのに有効であった。さらに、細胞表面からのGPI固定タンパク質を特に開裂させるNBL-Sセルラインの酵素PI-PLCによる事前処置は、RET及びすべてのダウンストリームシグナリングを活性化させるアルテミン能力を阻害するが、予測したようなNGFシグナリングに及ぼす効果を有しなかった(図9B)。したがって、上記データから、GDNFリガンドファミリーの他のメンバーと同様に、アルテミンはRETレセプタチロシンキナーゼを介してシグナルを送り、そうするためにはGPI固定コレセプタを要する。

### 【0172】

任意の公知のコレセプタアルテミンを利用してRETを活性化させるか否かを

調査するために、 $\text{GFR}\alpha 1$ 、 $\text{GFR}\alpha 2$ 又は $\text{GFR}\alpha 3$ の溶解性Fc融合形態直接結合するアルテミン能力を評価した。 $\text{GFR}\alpha 1$ -Fc、 $\text{GFR}\alpha 2$ -Fc及び $\text{GFR}\alpha 3$ -Fc融合タンパク質はR&Dシステムズ社から購入した。結合アッセイ (Binding assay) は、前記したアッセイ (Sanicola他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6238-6243, 1997) と同様に実行した。組換えGDNF、ニューロツリン、アルテミン、ペルセフィン又は精製ウシ血清アルブミン (BSA, ピース社製) を、 $25^{\circ}\text{C}$ で1時間かけて、TBS ( $10\text{mM}$ のTris-HCl,  $\text{pH} 7.5$ 、 $150\text{mM}$ のNaCl) 中 $325\text{ng/ml}$ で、Nunc-Immuno MaxiSorpマイクロタイタープレートに塗布した。プレートを洗浄し (TBS/ $0.03\%$  Tween-20で3回)、次いで、 $25^{\circ}\text{C}$ で1時間ブロックした (ブロッキング溶液: TBS/ $1\%$ のBSA)。ブロッキング溶液中で希釈したレセプタ抗体を添加し、 $25^{\circ}\text{C}$ で2時間インキュベートし、5回洗浄し、ブロッキング溶液中のHRP-複合アンチ-ヒトFc抗体 (ジャクソンイムノリサーチ社製) の $1:10,000$ 希釈液で、 $25^{\circ}\text{C}$ 45分間インキュベートした、最後に、ウェルを5回洗浄し、HRPの存在下で色素原基質3、3'、5、5'-テトラメチルベンジジンを5分間添加してアッセイした。同体積の $0.5\text{M}$ の $\text{H}_2\text{SO}_4$ を添加させて反応を停止し、色を $450\text{nm}$ でプレートリーダーにて測定した。レセプタ抗体のプレートへの非特異結合を、BSAを塗布したウェルで測定し、本結合がすべての他の測定から除算した。すべての実験は2回行い、結果を図9Cから図9Eに掲載する。

### 【0173】

本アッセイでは、 $\text{GFR}\alpha 1$ -FcがGDNFとニューロツリンの双方と同様な親和力で結合することができたが、ペルセフィン又はアルテミンとは結合しなかった。 $\text{GFR}\alpha 2$ -Fcはニューロツリンと結合したが、GDNF又はアルテミンとは結合せず、GDNFがRET存在下での $\text{GFR}\alpha 2$ とのみ結合するという以前の報告 (Sanicola他、1997) と一致した。興味深いことに、先のオーファンレセプタ $\text{GFR}\alpha 3$ -Fcはアルテミンと結合したが、他のGDNFリガンドファミリーのいずれとも結合せず、GDNF、ニューロツリン又はペルセフィンに対して機能的レセプタ複合体を形成することができない $\text{GFR}\alpha 3$ とRETの

能力と一致した (Baloh他、1998、前掲; Worby他、1998、前掲)。各レセプタ抗体はそれぞれのリガンドと見かけ上  $K_d$  が約 3 nM で結合し、本アッセイにおける以前に報告した  $GFR\alpha 1 - Fc$  と  $GDNF$  との間の親和力と同等である (Sanicola他、1997)。したがって、それぞれのレセプタと  $GDNF$  及び  $NTN$  の結合と類似の親和力で、アルテミンは先のオーファンレセプタ  $GFR\alpha 3$  と結合することができる。

### 【0174】

前記した結合データからは、 $GFR\alpha 3 / RET$  がアルテミンの機能性レセプタであることが示唆されるが、かかる直接結合の研究単独では、 $RET$  がレセプタ結合を調製することができるという観察のため (Sanicola他、1997、前掲)、すべての  $GDNF$  ファミリーレセプタ相互作用を予測することには頼りにできない。よって、レセプタ組合せがアルテミンの機能性レセプタを形成することが可能であることを直接試験するために、 $Gal4 - Elk / Gal4 - Luc$  レポータシステムと共に個々の  $GFR\alpha$  コレセプタの発現プラスミドを、 $RET$  を安定的に発現するフィブロblastへ一時的に形質転換させた。MAPキナーゼ活性に応答し、 $Gal4 - ルシフェラーゼ$  レポータの転写を活性化させる  $Gal4 - Elk$  融合タンパク質の能力を利用する本システムは以前にも利用されており、PC12細胞のMAPキナーゼ経路の  $NGF / TrkA$  活性化 (Vossler他、Cell 89: 73 - 82, 1997; York他、nature 392: 622 - 626, 1998) と、ニューロblastomaセルラインのMAPキナーゼの  $GDNF / RET$  活性化 (Worby他、1998、前掲; Worby他、J. Biol. Chem. 271: 23619 - 23622, 1996)。

### 【0175】

ラット  $GFR\alpha 1$  及びヒト  $GFR\alpha 2$  だけでなく、ヒト  $RET (RET - 3T3)$  を安定的に発現するMG87フィブロblastの発現プラスミドの発生は、以前、詳細に説明されていた (Baloh他、1997、前掲; Creedon他、1997、前掲)。  $GFR\alpha 3$  発現プラスミドの発生では、ヒト  $GFR\alpha 3$  の完全コードした領域を含有する断片を、ヒト下垂体cDNAライブラリーからPCR増幅させ、本断片をpCB6のKpnI及びBamHI部へ (Brewer, Methods in Cell Biol. 43: 233 - 245, 1994)、PCRプライマーへ遺伝子工学的に操作された部位を利用

して直接クローン化させた。GAL4-E1k1キメラ発現プラスミドはP. ストルクのギフトであった(オレゴンヘルスサイエンス大学のボルム(Vollum) 研究所)。

#### 【0176】

GFR $\alpha$ 2/RET (Inasey他、投稿済)を天然に発現するNLFニューロブラストーマ細胞、又はRET-3T3細胞は12のウェルプレート(85,000細胞/ウェル)にて載置され、レポータプラスミドGal4-LucとCMV-Gal4-E1k(それぞれ、250ng/ウェルと50ng/ウェル)で、トランスフェクション正規化用のCMV-lacZ(50ng/ウェル)、一つのCMV-GFR $\alpha$ 発現プラスミド(500ng/ウェル)と、製造者インストラクションによるSuperfect試薬(Qiagen社製)を利用したトータル1.5 $\mu$ gのDNA/ウェル用のキャリアとしてのpBluescript(650ng/ウェル)でコトランスフェクトさせた。RET-3T3フィブロプラストをDNA/Superfect混合物に37℃で一晩晒し、洗浄し、低血清(0.5%)培地へ載置し、(形質転換48時間後の)収集前に、50ng/mlのGDNF、アルテミン又はペルセフィンで6乃至8時間刺激を与えた。NLFニューロブラストーマ細胞を2時間DNA/Superfect混合物へ晒し、回収のために全血清培地へ一晩載置させ、次いで、(形質転換48時間後の)収集前の24時間、50ng/mlのGDNF、アルテミン又はペルセフィンを含有する低-血清(0.5%)培地へ移動させた。ルシフェラーゼ及び $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定は、ルミノメータを利用して測定され、前記したように実行した(Svaren他、EMBO J 17: 6010-6019, 1998)。2回測定サンプルの平均ルシフェラーゼ活性をコトランスフェクトさせたlacZレポータの $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性に対して正規化され、ホールド活性は全く処置されていない対照により、因子処置された細胞に正規化活性を除算することにより算出した。

#### 【0177】

多くの系での以前の報告と一致する図10Aに示すように、GDNFはGFR $\alpha$ 1/RET又はGFR $\alpha$ 2/RETを発現する細胞のRETシグナリングを活性化させたが、GFR $\alpha$ 3/RETを発現する細胞では活性化させなかった(Ba

loh他、1998; Baloh他、1997; Jing他、1997; Sanicola他、1997; Suvanto他、1997; Worby他、1998)。結合データから予測可能であるように、アルテミンは  $GFR\alpha 3/RET$  を活性化させることができるが、 $GFR\alpha 2/RET$  レセプタ複合体を活性化させることができなかった。興味深いことに、また、アルテミンは  $GFR\alpha 1/RET$  を発現する細胞の  $RET$  を活性化させることもできる。もっとも、 $GDNF$  よりはその程度は低い。

#### 【0178】

$RET$  及び  $MAP$  キナーゼ活性化（未公表データ）による  $GDNF$  に元来応答する神経セルラインである、 $NLF$  セルラインにより、上記結果は確認された。図10Bに示すように、 $GDNF$  に一層激しく応答し、アルテミンに対して応答性を示した  $GFR\alpha 1$  により形質転換された  $NLF$  細胞により、フィブロblastにて観測された結果を確認した。さらに、 $GFR\alpha 2$  ではなく  $GFR\alpha 3$  による  $NLF$  細胞の形質転換により、細胞がアルテミン刺激に応答可能になった。また、 $GFR\alpha 3$  により  $NFL$  細胞の形質転換により、たぶん、 $GFR\alpha 3$  の  $CMV$  主導過剰発現により細胞の  $GFR\alpha 2/RET$  複合体の相対量を低下させたので、 $GDNF$  に応答する細胞の能力が減殺し、機能的  $GDNF$  レセプタの数が低減した。

#### 【0179】

要約すると、直接結合データとインビトロレセプタ活性化実験と共に、アルテミンが  $GFR\alpha 3/RET$  レセプタ複合体の公知な  $GDNF$  ファミリーリガンドであるが、 $GDNF$  及びニューロツリンと同様に、 $GFR\alpha 1/RET$  レセプタ複合体をも活性化させることができることが明らかになった。

#### 【0180】

##### 例 8

本例は、 $GDNF$  リガンドメンバーと  $GFR\alpha$  レセプタファミリーの特異性と相互作用のクロストークを例示する。

#### 【0181】

$GDNF$  リガンドファミリーメンバーと  $GFR\alpha$  レセプタファミリーメンバーの模式的相互作用ダイアグラムを、図11に提示する。ニューロトロフィン類

(neurotrophins)を含む多くの他のリガンド／レセプタシステムと同様に、同システムは好適なリガンド／レセプタペアを有することを特徴とするが、さまざまなリガンド類とレセプタ類との間のクロストークが明白である。本ダイアグラムにアルテミンを付加させることにより、数多の新しい特徴が示される。第一に、本願で開示する直接的なレセプタ結合実験とレセプタ活性化実験の双方から、アルテミンはGFR $\alpha$ 3／RETレセプタ複合体を利用することができるGDNFファミリーリガンドであることを明らかにした。ある種の付加的研究により、RETの存在下で、GDNFはGFR $\alpha$ 3と結合することができる(Trupp他、1998)、本相互作用は被観測交差結合を要する点で、低親和力であり、その関連性は、インビトロでの多くの実験パラダイムにてRET活性化に至らないので(Baloh他、1998; Trupp他、1998; Worby他、1998)、不明確であることが示された。第二に、GFR $\alpha$ 1／RETレセプタ複合体は、すこぶる混沌としており、多くのインビトロのパラダイムからの結果は、GDNFの好適なレセプタであることと一致するが、また、ニューロツリン及びアルテミンも、インビボのあるシステムではGFR $\alpha$ 1／RETレセプタ複合体を利用するものと考えられる。GDNF及びGFR $\alpha$ 1-欠陥マウスとの間の抹消ニューロン損失の差異に関する最近の観察により、GDNFはインビボのレセプタとしてGFR $\alpha$ 2／RETを利用することができることが示唆され、代わりのリガンド／レセプタ相互作用にはGDNFファミリーの生物学的重要性があることが確認された(Cacalano他、1998; Enomoto他、1998)。さらに、神経栄養ノックアウトマウスを解析した最近の論文では、NT-3はインビボではTrkBを介してシングナルを送り、相互作用は何年も前のインビトロで観測されたが、インビボとは無関係であると考えられると結論付けた(Farinas I他、1998; Ip他、1993)。したがって、インビトロで確認された起こり得るすべてのリガンド／レセプタ相互作用を考慮することは、神経栄養因子の影響のインビボ解析の結果を利用するのには必要である。

#### 【0182】

さらに、本願で開示した直接結合及びRET活性化実験からの結果から、GDNF-GFR $\alpha$ 2相互作用と同様に、GFR $\alpha$ 1-Fc又はGDNFへ、GFR



$\alpha 2 - Fc$  レセプタ抗体へのアルテミンの直接結合は観測されていないので、アルテミン -  $GFR\alpha 1$  相互作用はRETの存在に依存することが示唆される(図9C; Sanicola他、1997)。これは、固定化リガンドへの溶解性レセプタ抗体結合を利用する結合アッセイの性質に起因する。しかしながら、これは、 $GFR\alpha$  コレセプタが、RETが存在しないときに発現する場合に、 $GDNF$  リガンド/ $GFR\alpha$  システムに利用可能であるという、さらなるレベルの特異性を別に反映している(Baloh他、1997; Golden他、1998; Trupp他、1997; Yu他、1998)。上記の状況では(つまり、損傷した抹消神経の $GFR\alpha 1$ と大脳皮質の $GFR\alpha 2$ 発現)、コレセプタは「トランス」型で発現され、RETを発現する細胞若しくは軸索に対してリガンド/コレセプタ複合体を分泌する又は存在すると仮定すると、結合相互作用のRET依存サブセットのみが可能である。

#### 【0183】

プラスミドの寄託： 以下のプラスミドはブタベスト条約の規定に基づき、VA20110-2209、マナサス市ブルヴァール大学、10801のアメリカンタイプカルチャーコレクションへ寄託した。以下に示す寄託番号は、寄託したプラスミドの存在が首尾よく確認された後に割り当てられ、必要手数料を納付した。前記プラスミドへのアクセスは特許出願係属中、37CFR1.14と35USC122の規定により、特許庁長官に許可された者には可能である。公衆への前記プラスミドの利用可能性の総ての制限は、本願に基づいて特許は許可されると、撤回されることなく排除される。また、指定された寄託は寄託日から30年に期間維持され、寄託の最後の要求後5年間、又は米国特許に基づく権利行使の期間、いずれも延長される。プラスミドが生存しなくなる、又は偶然にも破壊した場合には、生存しているプラスミドと交換する。本願での寄託材料への言及の意図は便宜上のみであり、本願記載の見地から、本発明を具現化することを要せず、さらに、上記材料は参考として本願に援用される。

#### 【0184】

#### 【表2】

プラスミド名	寄託日	ATCC 番号
phART	1998年12月22日	

上記に照らせば、発明の数多の効果が達成され、他の有利な結果を得られることが理解できる。

#### 【0185】

さまざまな変形態様は、本発明の範囲から逸脱することなく、前記方法及び組成物において可能であるので、前記説明に包含され、添付図面に示された総ての事項は、例示的であり、非制限的意味に解されることを意図するものである。

#### 【0186】

特許及び特許出願を含む本明細書で引用した全ての引用例は、参考として本願にて援用される。本願での引用例の議論は、単にその著者らによってなされた主張を要約したものであり、任意の引用例は先行技術を構成することを認めたものではない。出願人は、引用例の正確性及び関連性に対して異議を申し立てる権利を留保する。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1A】

明細書中で説明したように構築された相補的ヒトアルテミンゲノムヌクレオチド配列（配列番号(SEQ ID NO)：1から2）を示し、下に示す一つのリーディングフレームによりコードされたアミノ酸（配列番号(SEQ ID NO)：12）があり、ヌクレオチド配列及び起こり得るRXXRタンパク質分解処理部位をボックスで示す。

##### 【図1B】

ヒトブレ-プロ-アルテミンの相補的cDNA配列（配列番号(SEQ ID NO)：24と25）及びアミノ酸配列（配列番号(SEQ ID NO)：26）を示す。

## 【図1C】

マウスブレ-プロ-アルテミンの相補的cDNA配列(配列番号(SEQ ID NO): 27と28)及びアミノ酸配列(配列番号(SEQ ID NO): 29)を示す。

## 【図1D】

代わりにスプライシングされたヒトアルテミンmRNAを表わすあるヒトアルテミンcDNAクローンにて見出された第二のメチオニンから出発する、相補的cDNA配列(配列番号(SEQ ID NO): 30と31)及びアミノ酸配列(配列番号(SEQ ID NO): 32)を示す。

## 【図2A】

ボックスに囲まれた同一のアミノ酸残基と点線で示されたアラインメントプログラムにより挿入されたギャップとを有する、ヒトGDNF(hGDNF、配列番号(SEQ ID NO): 13)、ヒトニューロツリン(hNTN、配列番号(SEQ ID NO): 14)、ヒトペルセフィン(hPSP、配列番号(SEQ ID NO): 15)とヒトアルテミン(hART、配列番号(SEQ ID NO): 3)の予想された成熟形態のアミノ酸配列のアラインメントを示す。

## 【図2B】

ヒト及びマウス推定シグナル配列と、ブレ-領域と、陰のある部分(アミノ酸1から39、それぞれ、配列番号(SEQ ID NO): 51と配列番号(SEQ ID NO): 52)と、厚い線で示された推定RXXR開裂部位と、アルテミン遺伝子の二つのイントロンの位置を表示する矢印の頭を有する、ヒト及びマウスブレ-プロアルテミン(それぞれ、配列番号(SEQ ID NO): 26と29)のアラインメントを示す。

## 【図2C】

アルテミン遺伝子の二つのイントロンの位置と、アルテミンmRNAを産出させるスプライシンとの模式図であり、Met<sup>\*</sup>により示されるあるヒトcDNAライブラリーから単離されたcDNAのRACE PCRにより同定された第二の出発メチオニンの位置を示す。

## 【図3A】

第一の予想された成熟ヒトアルテミンポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号

(SEQ ID NO) : 3) とコーディング配列 (配列番号 (SEQ ID NO) : 6) 、並びにそのコーディング配列の相補体 (配列番号 (SEQ ID NO) : 9) を示す。

【図3B】

第二の予想された成熟ヒトアルテミンポリペプチドのアミノ酸配列 (配列番号 (SEQ ID NO) : 4) とコーディング配列 (配列番号 (SEQ ID NO) : 7) 、並びにそのコーディング配列の相補体 (配列番号 (SEQ ID NO) : 10) を示す。

【図3C】

第三の予想された成熟ヒトアルテミンポリペプチドのアミノ酸配列 (配列番号 (SEQ ID NO) : 5) とコーディング配列 (配列番号 (SEQ ID NO) : 8 (、並びにそのコーディング配列の相補体 (配列番号 (SEQ ID NO) : 11) を示す。

【図4】

ヒトGDNF (hGDNF、配列番号 (SEQ ID NO) : 16) と、ヒトニューロツリン (hNTN、配列番号 (SEQ ID NO) : 17) と、ヒトペルセフィン (hPSP、配列番号 (SEQ ID NO) : 18) とヒトアルテミン (hART、配列番号 (SEQ ID NO) : 19) の第一のカノニカルフレームワークシステインでの開始に適合させた、第一及び第七のカノニカルフレームワークシステイン残基間の領域のファミリーメンバー配列の同一性を示す。

【図5】

ヒトの成人組織及びヒトの胎児組織のアルテミン発現を例示し、図5Aには、図5Bに示すヒト組織から単離され、ヒトアルテミンcDNAの断片に寄りプロープされたポリ(A)RNAを含有するRNAスポットプロットを示す。

【図6A】

プローブとしてラットアルテミンcDNA断片から発生させた<sup>32</sup>P-標識化RNAプローブを利用して、胎児ラットのアルテミンは発現のインシチュハイブリダイゼーション解析を示す。図6Aは、頂部がくちばしで、左側が背であるように配置させた生後14日後(E14という)のラットの矢状断面を示し、背の根神経節ではシグナルは観測されず、存在しうる神経根(NR)では強いシグナルが観測され、矢印は上腸間膜動脈の側面延長部を表わすであろう肝臓の下で組織で観測された発現を示す。

## 【図6B】

プローブとしてラットアルテミンcDNA断片から発生させた<sup>32</sup>P-標識化RNAプローブを利用して、胎児ラットのアルテミンは発現のインシチュハイブリダイゼーション解析を示す。図6Bは、(A)と同じ配向のE14ラットの側矢状断面を示し、成長する上腸間膜動脈(SMA)を取囲む高レベルのアルテミン発現が検出された。

## 【図6C】

神経切断後の時間にて、大人の坐骨神経(N)からと、その坐骨神経の抹消セグメントからと、の新生児ラット(PS)から単離されたシュワン細胞中のアルテミン発現の半定量的RT-PCR解析を示す。

## 【図7】

培養中での抹消及び中枢ニューロンの生存を支援するアルテミンを示し、図7A及び図7Bは、5ng/mlの示す因子(図7Aでは平均SEMを示し、n=5から11)の存在下での、又は示す量のアルテミン(図7Bでは平均SEMを示す、n=5)の存在下での、生後1日(P1)ラットから培養された背根神経節(DRG)ニューロンの生存する細胞数のヒストグラムを示し、図7Cは、示す成長因子(平均SEMを示す、n=4)の存在下でのP1ラットから培養された三叉神経節(TG)ニューロンの生存する細胞数のヒストグラムを示し、図7Dは、BDNF(100ng/ml)又は示すGDNFファミリーリガンド(50ng/ml)(代表的な実験からの平均SEMを示す、n=2)の存在下にて、P0ラットから培養された結節性神経節(NG)ニューロンの生存する細胞数のヒストグラムを示し、図7Eは、5日間NGFの存在下で維持し、次いで、50ng/mlの示す因子(平均SEMを示す、n=2から8)の存在下で培養させた上けい神経節(SCG)の生存する細胞数のヒストグラムを示し、図7Fは、50ng/mlの示す因子(平均SEMを示す、n=9から15)の存在下で培養させたE14ラット(EVM)からのチロシンヒドロキシラーゼ発現(TH+)-ドーパミン作動性腹側中脳ニューロンの数のヒストグラムを示す。

## 【図8】

ニューロブラストーマセルラインでの分化及び増殖を誘発させるアルテミンを

示し、図8Aは、因子不存在(Cn)下で培養させたSK-SY5Yニューロblastoma細胞中の写真であり、図8Bは、上記細胞の分化の公知なインデューサである $10\mu\text{M}$ の全てトランスレチノイン酸(RA)存在下で、図8Cは、 $50\text{ng/ml}$ のアルテミン存在下での写真であり、図8Dは、 $50\text{ng/ml}$ の示す因子存在下でのNBL-Sニューロblastoma細胞によるBrduの取り込みのヒストグラムである。

#### 【図9A】

アルテミンがRETを活性化させ、主に培養させたSCGニューロンの下流シグナルは、因子なし(Cn)、GDNF又は $50\text{ng/ml}$ のアルテミン(ART)のいずれかで処置されたSCGニューロンからの溶菌液中のチロシンホスホリルRETまたはホスホリルMAPK(MAPK)のイムノプロットを示す。

#### 【図9B】

アルテミンはNBL-Sニューロblastoma細胞中のRETを活性化させ、細胞表面からGPI固定タンパク質を特に開裂する酵素PI-PLCの存在する場合と不存在の場合にて、図9Aのように刺激を与えたNBL-S細胞からの溶菌液中のチロシンホスホリルRET又はホスホリルMAPK(MAPK)のイムノプロットを示す。

#### 【図9Cから図9E】

GDNFリガンドファミリーメンバーへの $\text{GFR}\alpha 1\text{-Fc}$ 、 $\text{GFR}\alpha 2\text{-Fc}$ 及び $\text{GFR}\alpha 3\text{-Fc}$ レセプタ抗体の直接結合を例示し、GDNF、ニューロツリン、アルテミンまたはベルセフィンで塗布したマイクロタイタープレートへ添加した。次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)と結合させたアンチヒトFc抗体で処置し、色素原HRP基質3、3'、5、5'-テトラメチルベンジジンを利用して測定したレセプタ抗体の結合を、示した溶解性 $\text{GFR}\alpha\text{-Fc}$ 融合タンパク質の濃度を増加させてプロットした、 $450\text{nm}$ での吸光度の量のグラフであり、エラーバーは複数回の代表的な実験からの標準偏差を示す。

#### 【図10】

明確なコレセプタ成分の存在下でのGDNFリガンドファミリーメンバーによるレセプタ活性化を示し、RET発現MG87フィブロblast細胞(RET-

3T4) (図10A) にて、又は示すコレセプタ若しくはインサートのないCMVプラスミド(対照)の発現プラスミドとともにGal4Elk/Gal-Lucレセプタにより一時的に形質転換させたNLFニューロblastoma細胞(NLF) (図10B)の示す成長因子により誘発されたルシフェラーゼ発現量の棒グラフを示し、ホールドアクティベーションは、示す処置条件にて未処置対象によりルシフェラーゼ活性を除算することにより算出し、エラーバーは代表的な実験の複数回測定の標準偏差を表わす。

#### 【図11】

多くの実験パラダイムから導出されたGDNFリガンドファミリーのリガンド/レセプタ相互作用の模式図を示し、大きな矢印は好適なリガンドレセプタ相互作用を示し、小さな矢印は別のレセプタ相互作用を示す。

#### 【図12】

ヒト及びマウスGFR $\alpha$ 3レセプタ前駆体(それぞれ、配列番号(SEQ ID NO): 63と64)のアミノ酸配列のアラインメントを示し、同一の残基はボックスで取囲まれ、N-末端シグナル配列が陰があり(hGFRアルダ3のアミノ酸1から31と、mGFR $\alpha$ 3の1から28)、成熟GFR $\alpha$ 3(hGFR $\alpha$ 3のアミノ酸32から372と、mGFR $\alpha$ 3の29から369)、陰のあるGPIシグナルペプチドと一致する残基の陰のあるC末端疎水性ストレッチ(hGFR $\alpha$ 3のアミノ酸373から400と、mGFR $\alpha$ 3の370から397)と、黒のドットでマークしたN-結合グリコシレーション部位を示す。

#### 【図13】

N-末端シグナル配列(ヌクレオチド1から93)用のエンコーディング配列と、成熟GFR $\alpha$ 3(ヌクレオチド94から1116)用のエンコーディング配列と、GPIシグナルペプチド(ヌクレオチド1117から1203)と一致する残基のC-末端疎水性ストレッチ用のエンコーディング配列とを含むGFR $\alpha$ 3前駆体(配列番号(SEQ ID NO): 65)をコードするヒトヌクレオチド配列を示す。

#### 【図14Aから図14C】

アルテミン遺伝子(配列番号(SEQ ID NO): 68と69)と三つのリーディング





**Figure 1A-2**

[illegible]

**Figure 1B-1**

[illegible]



100  
115  
130  
145  
160  
175  
190  
200  
215  
230  
245  
260  
275  
290  
300  
315  
330  
345  
360  
375  
390  
400

**Figure 1C-1**

**Figure 1C-2**

[illegible]

**Figure 1D-1**

[illegible]

**Figure 1D-2**

Q E S R P A P P P A P S A L P C G R A A R A G C P C S R A R  
500  
A A A G A R C R L A S Q L V R V R A L G L G H R S D E L V R F P C  
600  
S S C R R R R P R D L S L A S L G A L R P P P G S A P V  
700  
S Q P C C R P T R Y E A V S F H D V H S T W R T V D L R A T A C

GCTGCCCTGGGCTGA  
714

SECRET

【図2A】

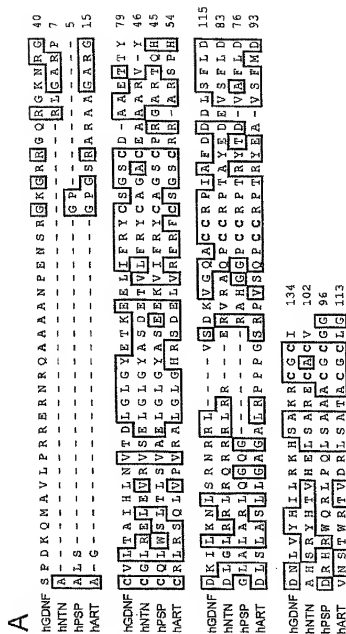


Figure 2A



[illegible]

Figure 2B

【图2C】

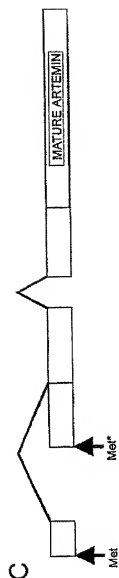


Figure 2C

[illegible]

**Figure 3A**

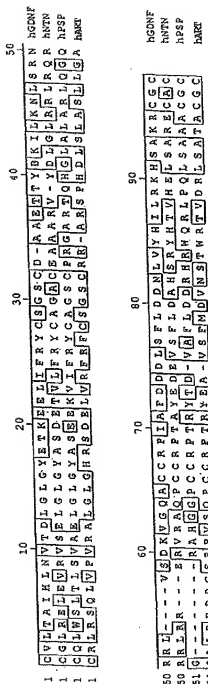
[illegible]

**Figure 3B**

**Figure 3C**

[illegible]

【图 4】

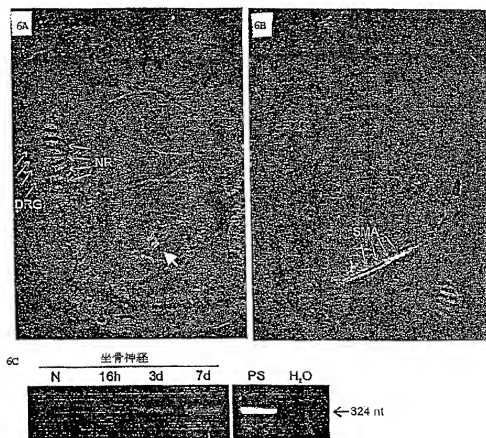


**Figure 4**

【図 5】

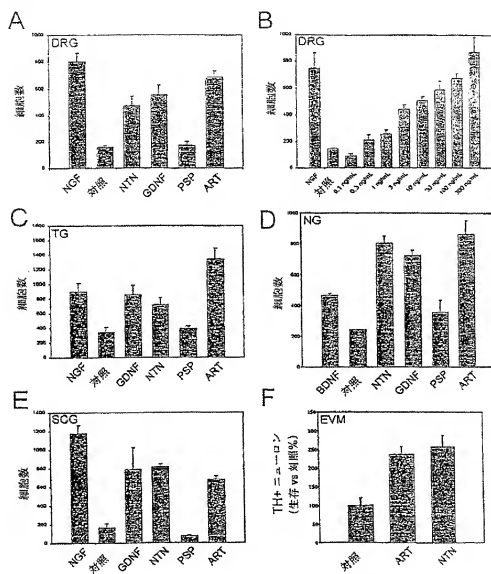
5A		5B							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A	全胚	尾状核	小脳	大脳皮質	前頭小葉	海馬	延髄		
B	後頭部	果核	黒質	側頭葉	視床	視床下部	脊髄		
C	心臓	大動脈	骨格筋	結腸	膀胱	子宮	前立腺	胃	
D	こう丸	卵巣	すい臓	下垂体	副腎	甲状腺	だ液腺	乳腺	
E	腎臓	肝臓	小腸	心臓	胸腺	末梢白血球	骨髄		
F	虫歯	肺	気管	胎盤					
G	胎児脳	胎児心臓	胎児腎臓	胎児肝臓	胎児心臓	胎児胸腺	胎児肺		
H	精虫全DNA	胎母全DNA	大腸菌DNA	大腸菌DNA	大腸菌DNA	ヒトDNA	ヒトDNA	ヒトDNA	ヒトDNA
		100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	500 ng

【图6】

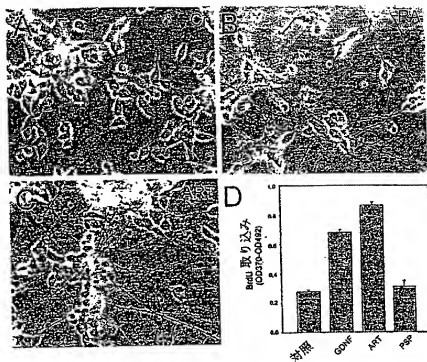




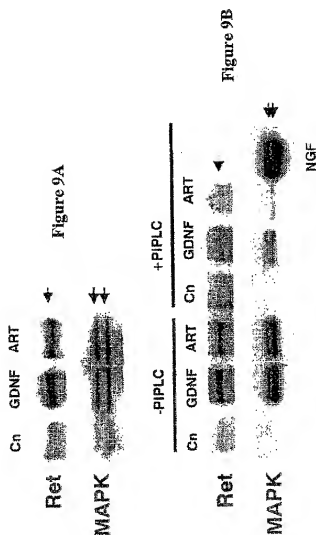
【図7】



【図8】



【図9A・B】



【図9C】

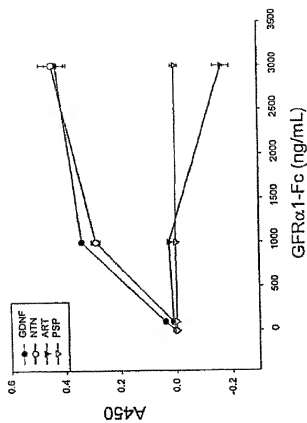


Figure 9C

【图9D·E】

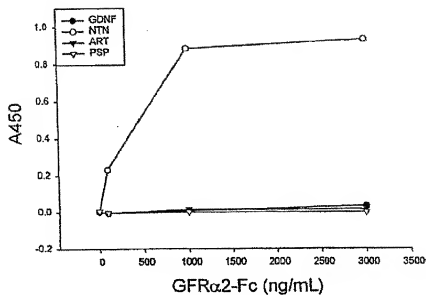


Figure 9D

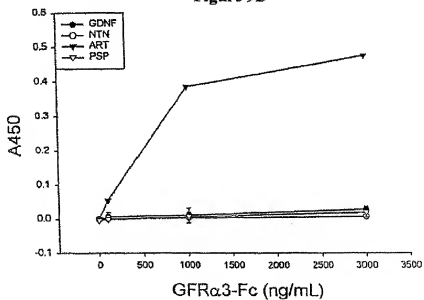
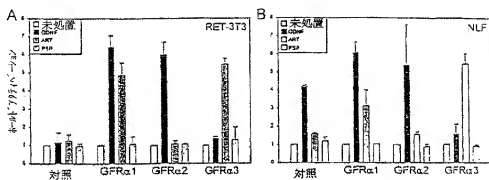
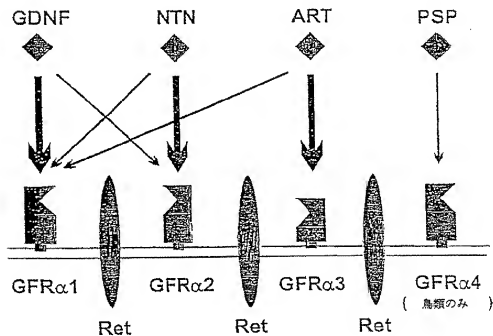


Figure 9E

【図10】



【図11】



【图12】

hGFRa3|N|V|R|P|L|N|P|R|P|L|P|V|V|L|M|L|L|L|L|P|P|S|P|L|P|L|A|C|D|P|I|P|T|E|S|R|L|M  
 mGFRa3|N|G|L|S|W|P|R|E|-|E|L|L|M|H|L|L|V|H|L|S|L|W|-|L|F|L|C|A|G|N|S|L|A|T|E|N|N|F|V  
 hGFRa3|N|S|C|I|Q|A|R|K|C|Q|A|D|B|T|C|S|A|Y|H|H|L|D|S|C|T|S|I|S|T|P|L|P|S|E|E|P|S|V  
 mGFRa3|N|S|C|T|Q|A|R|K|C|E|A|N|P|A|C|K|A|A|Y|Q|H|L|G|S|C|T|S|L|S|R|E|L|P|L|E|E|S|A|M  
 hGFRa3|P|A|D|C|L|E|A|P|Q|L|R|N|S|S|L|G|C|M|C|H|R|R|M|K|N|V|A|C|L|D|I|Y|W|T|V|H|R|A  
 mGFRa3|S|A|D|C|L|E|A|P|Q|L|R|N|S|S|L|D|C|R|C|H|R|R|M|H|Q|A|T|C|L|D|I|Y|W|T|V|H|R|A  
 hGFRa3|R|S|L|G|N|Y|E|L|D|V|S|P|Y|E|D|T|V|T|S|K|P|M|M|N|L|S|K|L|N|M|L|K|P|D|S|D|L|C|L|R|K  
 mGFRa3|R|S|L|G|D|Y|E|L|D|V|S|P|Y|E|D|T|V|T|S|K|P|M|M|N|L|S|K|L|N|M|L|K|P|D|S|D|L|C|L|R|K  
 hGFRa3|F|A|M|L|C|T|L|N|D|K|C|D|R|L|R|K|A|Y|G|E|A|C|S|G|P|H|C|O|R|H|V|C|L|R|Q|L|L|T|E|E|E  
 mGFRa3|F|A|M|L|C|T|L|H|D|K|C|D|R|L|R|K|A|Y|G|E|A|C|S|G|I|R|C|O|R|H|V|C|L|R|Q|L|L|T|E|E|E  
 hGFRa3|K|A|A|E|P|H|A|Q|G|L|L|C|P|C|A|P|N|D|R|G|C|G|E|R|R|R|N|T|I|A|P|N|C|A|L|P|V|A|E  
 mGFRa3|K|A|A|E|S|H|A|Q|G|L|L|C|P|C|A|P|E|D|A|G|C|G|E|R|R|R|N|T|I|A|P|N|C|A|L|P|V|A|E  
 hGFRa3|N|C|L|E|R|R|L|C|F|D|P|L|C|R|S|R|L|V|D|F|O|T|H|C|H|P|M|D|I|L|G|T|C|A|T|E|Q|S|R  
 mGFRa3|N|C|L|D|L|R|S|T|C|R|A|D|P|L|C|R|S|R|L|V|D|F|O|T|H|C|H|P|M|D|I|L|G|T|C|A|T|E|Q|S|R  
 hGFRa3|C|L|R|A|Y|L|G|I|G|T|A|H|T|P|N|E|V|S|N|V|N|T|S|V|A|L|S|C|T|C|R|G|S|G|N|L|Q|E|C  
 mGFRa3|C|L|R|A|Y|L|G|I|G|T|A|H|T|P|N|E|V|S|N|V|N|T|S|V|A|L|S|C|T|C|R|G|S|G|N|L|Q|E|C  
 hGFRa3|E|M|E|G|F|E|S|H|N|P|C|L|T|E|A|I|A|A|K|M|R|F|H|S|Q|L|F|S|Q|D|W|P|H|P|E|A|V|N|A  
 mGFRa3|E|M|E|G|F|E|S|Q|N|P|C|L|T|E|A|I|A|A|K|M|R|F|H|S|Q|L|F|S|Q|D|W|P|H|P|E|A|V|N|A  
 hGFRa3|H|Q|N|E|N|P|A|V|R|P|Q|P|N|V|P|S|L|E|S|C|T|L|P|T|I|L|L|S|L|M  
 mGFRa3|Q|Q|N|S|N|F|A|N|L|Q|E|R|L|E|I|L|S|F|S|I|L|P|L|L|Q|T|L|M

Figure 12

### Figure 13

[illegible]



**Figure 14A-1**

[illegible]

【図14A-2】

G T R T W R P L H A V P L F L A . A A G E W F S Q . L L P G T E K  
 E L G I G L S T L S H C P W R R Q V S G S S . L Y L V L S K  
 H N L O L E A S P R C F T A P L G R N . V N P F V T W Y . G K  
 -----  
 500  
 G G G G T A C G G T A C G G G T T G C T T G G G G G A A N N G T C L G G A G C C A G S T A N T G G G G G G G A  
 C C G G G A C T G A C C T C G C T C G G A G C A N C C T G C C A T C H C A C C T C C T T T T A C A T C C T C C G G T G C T T A C C T G T C C T  
 R R L D W . G E R A G L G L G S G . V W E G K W S G R D Q V N G R R S  
 G G L T G S E R A S H A V A V R C G E N G Q G G T A . H G G G  
 A A A A V E S R A N L G R L C V G K H V E Z G P G E W S E  
 -----  
 600  
 C G S A C T C T C T A N T G T G S T G A C T A G T G A T T C C T T G S S T C C C G G G G G A N C C A T E A C T G S A C C T A S C C T T C C G A G T T  
 G C C T A N A A A C T T A C C A C C A C G T G S T G T G T A G C G A G G A C C G A G G T C T G S T G T T T G S S T A T T A T T G A C C T T G A T C C G A N A G A C T A A  
 G T S L N S R C T Q V I F P L G S Q R Q T H Y T G F . A L P E F  
 A G L L . M V G A L R . F L F H A P R G S R F L S R F L S F  
 R D F S E W S V H S G D S P G L F C A N P L Y N L G S . V  
 -----  
 700  
 C C C T C C A C G T A G A G C C C H T C C G G C T G S T C T A G C C G A G A C C C C C T T A G A T C C T C C T C C C A G C C C A C T G S S T G C C T T  
 G S S S G T G T G T C S S T C T C G S S T A G G G C C G A C T A G A T C G S S T C C T C T C G S S S A N C T C A G A N A G A S S T T C G S S S A C C C G S S A A  
 P L R T A S S F C A . S Q P E D S P L R S L P K P T H V P S  
 S P T G L A N A P O L S P R T A P P . G D S S P S P P G C P L  
 S P R S E R M P G L I S A R G Q P L L E V L P Q A H L G A L F

Figure 14A-2



【図14B-2】

S A F A P P P A F F S A L F R G G R A A R A G G P G S R A R A G  
 L G F R P R R L H F L L F P A G A A R G L A A R A A A A A A A A  
 S A R A P A R C T F I C S F A G G G G G G G G G G G G G G G G  
 G  
 C G G G C C G A C G C G A C G G G G G G G G G G G G G G G G G G  
 G  
 A R G C L E S O L V P V R A L G L G H S D E L V R F R F C S G  
 S A C A A C A R S C R C A R S A W A T A P T S W C V S A S A A  
 G A G L F A L A G A G A A R F G P P L R R A G A F F L L Q R  
 T C C T C C C A C  
 A G A C  
 S C R A R S P H D L S L A S L G A G A L R P P G S R P V S Q  
 P A A A R A L E T T S A H P A Y W A P G P C D R F R A P S A  
 L P P R A L S T R P Q G T T G R G R A T A G P A R G P A  
 C T G T C C C A C C C G C  
 G A C A C  
 F C C R P A V E A V S F N D V H S T W R T V D R L S A T A C G C L  
 P C R A T A K R S P S M T S A P G K P M T A S P F P P A A A  
 L P T H A L R S G L H G R O Q H E N A G F P L R H R L R L P

Figure 14B-2

**Figure 14C**

[illegible]

【図15】

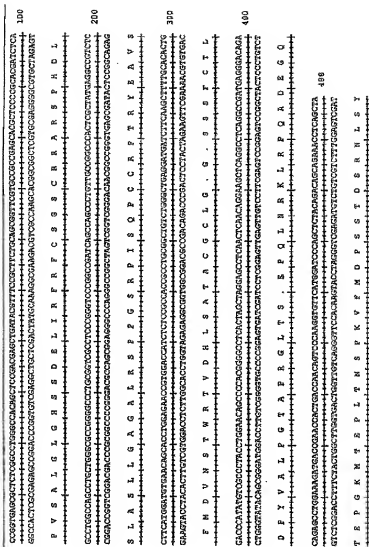


Figure 15

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP99/22604
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : Please See Extra Sheet. US CL : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Extra Sheet.		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <b>NON*</b>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,739,307 A (JOHNSON, JR. ET AL) 14 April 1998 (14/04/98), see entire document.	1-38
A	US 5,747,655 A (JOHNSON, JR. ET AL) 05 May 1998 (05/05/98), see entire document.	1-38
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Symbolic description of cited document:	* document published after the international filing date is priority data and not to be taken into account with the application but cited to understand the prior art or history underlying the invention ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as obvious in view of the prior art *** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as obvious in view of the prior art **** document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* document published after the international filing date is priority data and not to be taken into account with the application but cited to understand the prior art or history underlying the invention ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as obvious in view of the prior art *** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as obvious in view of the prior art **** document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
** document published on or after the international filing date	* document published after the international filing date is priority data and not to be taken into account with the application but cited to understand the prior art or history underlying the invention ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as obvious in view of the prior art *** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as obvious in view of the prior art **** document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
*** document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document (see special remarks on page 2)	* document published after the international filing date is priority data and not to be taken into account with the application but cited to understand the prior art or history underlying the invention ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as obvious in view of the prior art *** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as obvious in view of the prior art **** document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
**** document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	* document published after the international filing date is priority data and not to be taken into account with the application but cited to understand the prior art or history underlying the invention ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as obvious in view of the prior art *** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as obvious in view of the prior art **** document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
***** document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	* document published after the international filing date is priority data and not to be taken into account with the application but cited to understand the prior art or history underlying the invention ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as obvious in view of the prior art *** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as obvious in view of the prior art **** document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
17 DECEMBER 1999	10 FEB 2000	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks BPA PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer PREMA MERTZ Telephone No. (703) 305-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/22604A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:  
IPC (7)

C07K 14/47; C12N 5/10, 13/12, 13/16, 15/63, 15/64; A61K 38/36, 38/17, 38/18, 39/395, 48/09

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:  
US CL :

536/358.359; 536/23.1, 23.5, 23.51, 24.3, 24.31; 514/2, 8, 12, 44; 435/69.1, 69.4, 70.1, 71.1, 71.2, 471, 523, 373, 252.3, 254.11, 330.1, 6, 7.1, 7.2

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched  
Classification System: U.S.

536/358.359; 536/23.1, 23.5, 23.51, 24.3, 24.31; 514/2, 8, 12, 44; 435/69.1, 69.4, 70.1, 71.1, 71.2, 471, 523, 373, 252.3, 254.11, 330.1, 6, 7.1, 7.2

B. FIELDS SEARCHED  
Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

WEST, CAS ONLINE, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

search terms: antisense, growth factor, polypeptide, polynucleotide, cDNA, cDNA, cDNA, recombinant production, antibody, detection, assay, hybridization, treatment, method, therapy.



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード (参考)
A 6 1 P	19/00	A 6 1 P	25/02
	21/00		25/14
	25/02		25/16
	25/14		25/28
	25/16		31/00
	25/28		35/00
	31/00	C 0 7 K	14/475
	35/00		16/22
C 0 7 K	14/475	C 1 2 N	1/15
	16/22		1/19
C 1 2 N	1/15		1/21
	1/19	C 1 2 Q	1/68
	1/21	C 1 2 N	15/00
	5/10		5/00
C 1 2 Q	1/68	A 6 1 K	37/02
(31)優先権主張番号	09/218, 698		
(32)優先日	平成10年12月22日(1998. 12. 22)		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, C R, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, K Z, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, S L, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, U Z, VN, YU, ZA, ZW		A Z N A A A

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA01 BA61 CA01  
                   CA09 FA01 GA11 GA18 HA12  
 4B063 QA01 QA19 QQ53 QR32 QR55  
                   QS34 QX01  
 4B065 AA91Y AA93Y AB01 AC14  
                   BA02 BB19 CA24 CA25 CA44  
 4C084 AA02 AA13 BA44 CA18 CA23  
                   DB59 MA02 NA14 ZA012  
                   ZA022 ZA162 ZA202 ZA362  
                   ZA662 ZB262  
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA15  
                   CA40 DA21 EA21 EA50 FA74

本誌掲載物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。  
取扱いにあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

④

Bioconjugate Chem. 1999, 10, 973-981

973

## Prolonged Circulating Lives of Single-Chain Fv Proteins Conjugated with Polyethylene Glycol: A Comparison of Conjugation Chemistries and Compounds

L. Stanford Lee,\* Charles Conover, Celine Shi, Marc Whitlow,<sup>†</sup> and David Filipula\*

Eronn Inc./SCA Ventures, 20 Kingsbridge Road, Piscataway, New Jersey 08854-3969. Received June 14, 1999;  
Revised Manuscript Received August 16, 1999

The utility of single-chain Fv proteins as therapeutic agents would be substantially broadened if the circulating lives of these minimal antigen-binding polypeptides were both prolonged and adjustable. Poly(ethylene glycol) (PEG) bioconjugate derivatives of the model single-chain Fv, CC49218 sFv, were constructed using six different linker chemistries that selectively conjugate either primary amines or carboxylic acid groups. Activated PEG polymers with molecular weights of 2000, 5000, 10 000, 12 000, and 20 000 were included in the sFv bioconjugate evaluation. Additionally, the influence of PEG conjugate geometry in branched PEG strands (U-PEG) and the effect of multimeric PEG-sFv bioconjugates on circulating life and affinity were examined. Although random and extensive Fv polymer conjugations have been achievable in highly active derivatives of the prototypical PEG-enzymes, PEGylation of CC49218 sFv required stringent adjustment of reaction conditions in order to preserve antigen-binding affinity as measured in either murine-specific or whole cell immunassays. Purified bioconjugates with PEG:sFv ratios of 1:1 through 2:1 were identified as promising candidates which exhibit sFv affinity (K<sub>d</sub> values within 2-fold of the unmodified sFv protein. Interestingly, PEG conjugation to carboxylic acid moieties, using a PEG-hydrazide chemistry, achieved significant activity retention in bioconjugates as a higher PEG:only ratio (5:1) than with any of the amine-reactive activated PEG polymers. Prolonged circulating life in mice was demonstrated for each of the PEG conjugates. An increase in PEG polymer length was found to be more effective for serum half-life extension than a corresponding increase in total PEG mass. For example, CC49218 sFv conjugated to either one strand of PEG-5000, or four strands of PEG-5000, displayed about 20- or 14-fold increased serum half-life, respectively, relative to the unmodified sFv. The demonstrated suitability of established random conjugation chemistries for PEGylation of sFv proteins, in conjunction with innovative site-specific conjugation methods, indicates that production of a panoply of sFv proteins with both engineered affinity and tailored circulating life may now be achievable.

### INTRODUCTION

The immunoglobulin superfamily in vertebrates consists of antigen-binding domains—the Fv modules—which may be employed within the animal in a limited number of Fc formats corresponding to IgG, IgM, IgA, IgE, and IgD isotypes. The utility of antibody-derived therapeutics has been confined by the restrictive circulating lives and associated Fc effector functions of mAbs. It has been the goal of antibody engineers to greatly extend the versatility of antigen-binding proteins by tailoring the binding properties, valency, effector functions, and pharmacokinetic behavior of immunomolecules through protein engineering and bioconjugate strategies. The single gene, single polypeptide design of single-chain Fv proteins provides a minimal antigen-binding format which has been extensively explored by antibody engineers in the past decade (1–3). Early clinical trials are employing sFv derived therapeutics as immunotoxins, imaging agents, antagonists, targeting agents, and intracellular antigen-binding compounds (4–7). The clinical versatility and therapeutic efficacy of sFv proteins may be expanded by drug delivery technologies that provide control over the

rate at which these small protein compounds are cleared from circulation via renal filtration. The use of very high-affinity human sFv molecules or multivalent/multi-specific formats are promising solutions to this challenge (8–13). However, to provide a more general approach to controlling the circulating lives of sFv proteins, we wished to investigate the potential of a bioconjugate strategy that is clinically well established for enhancing the efficacy of other protein drugs.

Two FDA licensed therapeutics and several compounds undergoing clinical trials employ PEGylation,<sup>1</sup> the conjugation of compounds with poly(ethylene glycol) polymers, to prolong circulating life and reduce immunogenicity. In general, activated PEG polymers reactive with primary amines have been employed and PEG conjugation of the majority of available lysine residues on enzyme therapeutics such as adrenergic deaminase and asparaginase has provided extensively modified derivatives which still maintain specific activities similar to the unmodified enzymes (14–18). In comparison, PEGylation of cytokines, hormones, and other small protein ligands generally represents a greater challenge in enhancing the clinical potency of the PEG derivatives due to the opposing effects of (1) a reduction in receptor binding affinity versus (2) a prolonged circulating life relative to the unmodified proteins (17–23). The antigen-binding site may constitute about one-third of the Fv

\* To whom correspondence should be addressed. Phone: (732) 950-4500. Fax: (732) 983-3380.

<sup>†</sup> Present address: Becton Dickinson, 15040 San Pablo Ave., PO Box 4099, Richmond CA 94804-0099.

Cited Ref 4

本取組物は、特許庁が特許権を授けず、また特許権の期限により保護されたものである。  
 取組にあたっては、著作権侵害とならないよう十分に注意されたい。

surface area (24) and reactive amines or carboxyls are prevalent surface moieties on the hypervariable and framework regions of essentially all Fv sequences (25). Consequently, extensive random conjugations may be inactivating either through direct attachments to antigen-binding contact residues or as a result of transient steric hindrance and diffusional constraints from the long polymer strands.

We have previously reported the successful construction of sFv variants with engineered cysteine or N-glycan sites which retain binding activity following site-specific single or multiple PEG attachments (4, 26). However, these structural adjustments are not suitable for all therapeutic sFv applications. In this report, we describe the controlled application of conventional random PEGylation chemistry to a library of debiased PEG-CC49218 sFv compounds which have binding affinities comparable to the parent compound, yet display markedly extended circulating lives that correlate with the mass and length of the attached polymers. We also demonstrate the capacity of hemifunctional PEG polymers to generate multivalent sFv compounds that display increased functional affinity (avidity) and may stimulate the long circulating life and multivalency of antibodies.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials.** The *Escherichia coli* GX3251 expression strain for production of CC49218 sFv protein has been described (27). Percent polyacrylamide gels (4–20%) were obtained from Novex (San Diego, CA). Bovine submaxillary mucin type I was purchased from Sigma (St. Louis, MO). Superdex 75 was obtained from Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). POROS HS was purchased from PerSeptive Biosystems (Framingham, MA). Rabbit anti-CC49218 sFv polyclonal antibody was obtained from HRP (Denver, PA). Mouse anti-CC49218 polyclonal antibody was supplied by Enzo. PEG-hydrazide hydrochlorides (Hi-PEG-5000, PEG-tris(hydroxymethyl) carbonate (TPC-PEG-5000), and tri(hydroxymethyl) carbonate (NHS-PEG-3400-biotin)) were obtained from Shearwater Polymers (Birmingham, AL). Biotinylated carbonate PEG (SC-PEG), thiazolidine-2-thione PEG (T-PEG), branched SC-PEG (U-PEG), and bifunctional SC-PEG (BSC-PEG) were synthesized by Enzo as previously reported (16, 28–30). Calibrated PEG-molecular mass standards were obtained from Enzo.

**Purification and Characterization of CC49218 sFv Protein.** The purification of clinical-grade CC49218 sFv from *E. coli* expression strain GX3251 by refolding and cation-exchange chromatography has been described

in detail (27). Purified sFv was further characterized by SE-HPLC and RP-HPLC as previously reported (10, 27, 28). Protein determination employed the BCA (Bio-Rad reagent kit) procedure according to the vendor's instructions (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

**Molecular Modeling.** The model of 4-4-50212 sFv was constructed on an Evans & Sutherland P530 using Frodo, starting from the 4-4-20 Fab structure (PDB entry 1FL8). Poly(hydroxy glycol) strands were modeled on surface accessible lysine residues, L112, and H78 (26), using the program Add\_PEG (written by M. Whittaker). Add\_PEG defines the PEG polymer one atom at a time, checking such for unfavorable contacts. Each atom is added using a random procedure that generates trans, gauche<sup>+</sup>, and gauche<sup>-</sup> in the ratios of 0.668:0.16:0.16.

**Chemical Analysis of PEG-sFv Derivatives.** Three methods were employed for determination of the stoichiometry of PEG attachment on sFv protein. First, the TNBS method of Haber (32) was performed for quantitation of free primary amines. Second, the molecular mass of individual PEG-sFv compounds was estimated by SDS-PAGE and compared to calibrated PEG-protein standards with known PEG:protein stoichiometry. Proteins were electrophoresed on precast 4–20% slab gels and protein bands were visualized with Coomassie Brilliant Blue G-250. Area quantitation of stained bands was performed using a Molecular Dynamics FD-51 laser scanner. PEGylated polypeptides exhibit reduced mobility on SDS-PAGE compared to unmodified polypeptides of equivalent molecular mass. For example, PEG-sFv molecules containing one PEG-5000 linear unbranched polymer per protein display an increased molecular mass of approximately 10 kDa compared to the unmodified sFv. Area quantitation of stained bands was also used to estimate the percentage of each PEG derivative if the conjugation reaction produced multiple fractions. The PEG:sFv stoichiometric values are reported as the average for the integrated distribution. Third, size-exclusion HPLC was performed on selected PEG-sFv samples to analyze the molecular size of the derivatives compared to PEG-proteins with calibrated polymer numbers.

**PEG Modification of Primary Amines.** The model CC49218 sFv protein contains 10 primary amine groups including lysines and the N-terminus. The amine-reactive PEG polymers examined in this study included SC-PEG with molecular masses of 200, 500, 10,000, 12,500, and 20,000; U-PEG-10000; NHS-PEG-3400-biotin; T-PEG-5000; T-PEG-12000; and TPC-PEG-5000. Chemical conjugation chemistry for these polymers have been published (16, 28–32). While phosphate buffers are commonly employed in these protocols, the choice of buffer buffers may beneficially influence the PEGylation reaction rates and resulting products. As an example, for derivatives modified with SC-PEG-5000, the CC49218 sFv (2 mg/mL) in 0.1 M sodium borate buffer, pH 8.0, was reacted with SC-PEG at the designated molar ratios for 1 h at 25 °C. The reaction was quenched by the addition of 50 mM glycine and the product was purified by Superdex 75 SE-HPLC.

**PEG Modification of Carboxyl Sites.** The CC49218 sFv protein sequence includes 18 aspartic acid/glutamic acid groups in addition to the carboxyl terminus of the polypeptide. The utility of PEG-hydrazide in selective modification of carboxylate-activated protein carboxyl groups under acidic conditions has been described (16, 33). CC49218 sFv protein (2 mg/mL) in 50 mM NaCl was adjusted to pH 4.75 by addition of HCl. PEG-hydrazide powder was added to a final molar excess of 200-fold. The reaction was initiated with the addition of FDC in 100:1

<sup>1</sup> Abbreviations: AUC, area under the curve; BSA, bovine serum albumin; BSC-PEG, bifunctional SC-PEG; CD, circular dichroism; DTT, dithiothreitol; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylamino) carbonyl imidazole hydrochloride; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HRP, horseradish peroxidase; H<sub>2</sub>, hydrazide; NHS, N-succinimidyl; sFv, multivalent sFv; MKT, mass retention time; MT, 1-(4-methylthio)-5-(2-pyridyl)-2-pyridinemethanol bromide; NHS, N-succinimidyl; PBS, phosphate buffered saline; PEG, poly(hydroxy glycol); SC, succinimidyl carbonate; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SE-HPLC, size-exclusion-high performance liquid chromatography; sFv, single-chain Fv protein; t<sub>1/2</sub>, serum half-life; TAC, tumor-associated glycoprotein; TMR, 3,3',5,5'-tetraacetylbenzidine; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid; TPC, tri(hydroxymethyl) carbonate; T-PEG, thiazolidine-2-thione PEG; Tis, tri(hydroxymethyl)aminomethane; U-PEG, branched PEG; Tis, tri(hydroxymethyl)aminomethane.

本報掲載は、特許庁が著作権侵害など多岐にわたる権利の侵害により取扱いを禁じたもので、  
取扱いにあたっては、著作権侵害などとならぬよう十分に注意ください。

#### PEGylated Single-Chain Fv

molar quantities relative to the sFv protein. The reaction was allowed to proceed for 45 min, while maintaining the pH (4.75–5.0). The reaction product was chromatographed on size-exclusion–HPLC and high molecular weight fractions were isolated.

**Bifunctional PEG Modification of CC49218 sFv.** The bifunctional activated PEG polymer BSC-PEG-5000, which includes one activated SO group at each of the two polymer termini, was utilized in cross-linking reactions to produce multimeric Fv (mFv). BSC-PEG-5000 (1.89 mg) was dissolved in 0.1 mL of 25 mM Mops (3-[N-morpholino]propane-sulfonic acid) buffer, pH 7.3. Within 10 s of dissolution, the PEG solution was added to CC49218 sFv protein (1.5 mg/mL) in 2 mL of PBS (25 mM sodium phosphate, pH 7.3, 0.15 M NaCl). The mixture was stirred for 1 h at 24 °C. The reaction was terminated by addition of solid guanidine hydrochloride (GuHCl) to a final concentration of 0.6 M. The material was immediately applied to a 2 cm × 60 cm Superdex 75 SE-HPLC column previously equilibrated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.3, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride), 50 mM KCl, and 10 mM GuHCl. Following fractionation of heterogeneous multimers by gel filtration chromatography, monomer, dimer, and trimer fractions were identified from comparisons to calibrated PEG-Fv standards by SDS–PAGE and SE-HPLC.

**ELISA for sFv Binding Activity.** Immunoassay procedures were performed using modifications of previously published procedures [10, 34–36]. Bovine submaxillary mucin (1 µg/100 µL well) was used to coat microtiter plates with (Maxisorb; Nunc, VWR Scientific, Boston, MA). The purified CC49218 sFv protein or PEGylated sFv derivatives were diluted serially in PBS containing 1% BSA and incubated in the coated wells at 22 °C for 1 h. After the plate had been washed with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T), the bound sFv was detected by a 1 h incubation with a secondary anti-CC49218 sFv rabbit serum (1:2000) followed by a PBS-T wash and a 1 h incubation with an HRP-conjugated goat anti-rabbit serum (1:2000 dilution) at 22 °C. The plates were washed three times with PBS-T. After addition of 50 µL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and 50 µL of 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, as described by Hoxley and Lane [36], the plate was read at 450 nm using a Molecular Devices (Sunnyvale, CA) plate reader.

**Competition ELISA.** The apparent affinity constants (*K<sub>d</sub>*) of the PEGylated sFv derivatives were determined using biotin-labeled CC49218 sFv in competition immunoassays as reported previously [24, 38]. HRP-conjugated streptavidin (Pierce) was employed as the detection agent.

**ELISA for Relative Affinity of Multimeric Fv.** The method of Friguet et al. [38] was used for comparison of the relative affinities of mFv derivatives. PEGylated CC49218 sFv compounds were incubated at varied molar ratios with bovine submaxillary mucin in PBS for 24 h at 4 °C. ELISA determinations of the unbound and bound sFv fractions were performed as described above.

**Circulating L6E in Mice.** Pharmacokinetics of sFv and PEGylated sFv derivatives were measured in ICIR (CD-1) 7–8 week-old mice supplied by Harlan Sprague Dawley (Dixfield, VT). A single injection (200 µL) with 60 µg of protein of PEG-sFv derivatives was performed via the tail vein. After compound administration, sampling of blood (100 µL) via the rectal infundibulum was undertaken following anesthetization with 0.05% Avertin. In the intranasal standard protocol (*N* = 6): three mice were bled at 2 min and 1, 4, and 8 h; three other

*Bioconjugate Chem.*, Vol. 10, No. 9, 1999 975

mice were bled at 15 min, and 2 and 6 h; all six mice were bled at 24 h. Blood was allowed to clot and then processed for serum and immunoblot assays. The concentrations of the modified, active sFv were measured by ELISA. The circulatory half-life, area under the curve, and mean residence time for the sFv compounds were calculated using a one-compartment i.v. bolus model (WinNonlin software package, Scientific Consulting, Apex, NC). The correlation between the observed and predicted model time points was 2.95%.

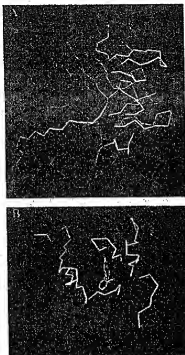
#### RESULTS AND DISCUSSION

**Characterization of Purified CC49218 sFv.** The detailed purification protocol for clinical-grade CC49218 sFv, which recognizes the human pancreatic carcinoma antigen TAG-72, has been reported [37]. Validated CC49218 sFv protein (72) was determined by SDS–PAGE and SE-HPLC to exhibit >99% homogeneity. We have previously reported that CC49 sFv with the 18 residues "216" linker maintain a monomeric rather than multimeric structure [39]. SE-HPLC characterization of CC49218 sFv demonstrated that multimeric Fv species constitute less than 1% of the freshly purified protein preparation. Mass-binding activity of the sFv protein was characterized by ELISA and competition ELISA as previously described [38] and the apparent dissociation constant, *K<sub>d</sub>* =  $4.5 \times 10^{-8}$  M, was determined as previously reported [28].

**Molecular Modeling of PEGylated sFv.** Covalent attachment of poly(ethylene glycol) polymers is a proven drug delivery strategy which is employed in established FDA-licensed protein therapeutics and several ongoing clinical trials of experimental medicines [14, 15]. Initial success in the use of random and extensive PEGylation of enzyme therapeutics having small molecule substrates demonstrated the capacity of many such enzymes to tolerate PEG conjugation on the majority of the surface lysines while maintaining suitable enzymatic specific activity. In contrast to this global conjugation approach for enzymes, a more parsimonious PEGylation strategy is mandated for small protein ligands such as cytokines, hormones, and peptides [17, 18, 29] by utilizing either site-specific conjugations or controlled and limited conjugations. The goal of these studies is to introduce the benefits of prolonged circulating life and diminished clearance by PEGylation, while maintaining acceptable biological activity for the bioconjugate. As shown in Figure 1, single-chain Fv molecules constitute a family of small proteins with six hypervariable antigen-binding loops (CDRs) within a conserved  $\beta$ -sheet framework architecture. We have shown previously (4, 28) that the use of site-specific sFv conjugations to engineered cytokines or  $\alpha$ 1<sub>1</sub> is a promising approach for selected applications. However, it would also be desirable to develop sFv PEGylation methodologies that employ clinically explored linker chemistries, which also do not require an alteration of the primary sequence of the sFv of interest. Molecular modeling of a representative sFv protein conjugated at two exposed lysines to PEG-12000 polymers is illustrated in Figure 2. The model sFv protein is derived from the available crystal structure of 4-4-20 anti-fluorescein Fab [28].

The degree of surface exposure of lysine, aspartic acid, and glutamic acid residues for 34 Fv structures is shown in Table 1. These three amino acid residues are partially to completely exposed for most Fv residues assignments. About 21% percent of the surface-exposed lysines and 27% of the exposed carboxyls occur within the CDR segments, though not necessarily in antigen contacts. In

本複製物は、特許庁が著作権法第23条第2項第2号の規定により複製したものです。  
複製にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。



**Figure 3.** Two views of the  $V_L$  linker- $V_H$  anti-thrombin 4-6-20/212 afv model based on the Pdb crystal structure. The  $V_L$  is shown in red, the  $V_H$  in blue, the linker in yellow and the antigen in green. The CDRs have been highlighted in light shades. (a) Antigen-binding site is at right in the scaffold tracing model. (b) The molecule shown in panel a is rotated 90° on two axes placing the antigen-binding site in the center of the afv model.

addition, single-chain Fv proteins have an exposed amine at the N-terminus and an exposed carboxyl group at the C-terminus plus additional target residues within the engineered linker peptide (Figure 1). While the correlation of the degree of surface exposure of these residues and their reactivity to conjugation will also be influenced by regional chemical and steric factors, the prevalence and dispersity of these three amine acids on Fv surfaces suggest that optimal PEGylation chemistries for these target residues may need to be carefully tailored for individual afv. We chose as a model protein, CC49/218 afv, which was recently investigated clinically as an imaging agent for metastatic colorectal carcinoma (57). The afv exhibited rapid blood and whole body clearance, almost exclusively via renal clearance. As shown in Figure 3, we have chosen a fairly challenging model murine afv wherein four of the total 19 lysines are within designated CDR regions while five of the total 19 aspartic/glutamic acid residues are within CDR loops. In comparison, the Kabat consensus sequence for a pro-

typical human  $V_L$ /218/ $V_H$ III afv contains 11 lysines (five in CDRs) and 17 aspartic/glutamic acids (five in CDRs) if the most commonly occurring amine acids at each position are represented (28).

**PEGylations of afv Primary Amines.** Two critical parameters, (a) relative binding affinity and (b) circulatory retention in mice, were evaluated for PEGylated afv compounds using five different activated PEG linker chemistries. In addition, PEGylated afv conjugates were evaluated by SDS-PAGE, SE-HPLC, and chemical analysis in order to estimate the polymer:protein stoichiometry and heterogeneity of the compounds. The PEGylation reaction conditions (see Experimental Procedures) require an excess of activated PEG relative to afv protein, and the relative stoichiometry and reaction times were adjusted to optimize the polymer number on the bioconjugate while also maintaining acceptable binding activity. The five amine reactive linker chemistries included succinimidyl carbonate (SC-PEG), thiazolidine-2-thione (T-PEG), N-hydroxysuccinimide (NHS-PEG), trifluorophenyl carbonate (TPC-PEG), and branched SC-PEG (J-PEG). Incremental PEG polymer lengths of 2, 5, 12, and 20 kDa were additionally investigated for the SC-PEG linker chemistry. PEGylated afv proteins were purified by SE-HPLC and cation-exchange chromatography to completely separate bioconjugates from any remaining unmodified afv protein. Our initial ELISA results indicated that attachment of greater than four PEG polymers per afv using any of these five methods resulted in diminution of afv apparent affinity by 30–100-fold (data not shown). Consequently, we focused our attention on the goal of producing minimally PEGylated afv, which displayed apparent binding affinities within one log value of the unmodified protein. Figure 4 shows an SDS-PAGE analysis of the bioconjugate preparations used in the subsequent ELISA and pharmacokinetic studies. While random conjugation chemistries are expected to produce heterogeneous mixtures of bioconjugates that correspond to difference in the number of modified amines, the overall dispersity in bioconjugate masses under our optimized reaction conditions was relatively limited as seen in Figure 4. For most reactions, the production of a single predominant molecular size of PEG-afv was observed, which may be accompanied by a subpopulation of bioconjugates of larger molecular size. This simplified the estimation of the average PEG number per afv protein in the purified preparations. Under the selected reaction conditions, one major molecular mass constituted the majority of the total PEGylated afv product using all of the amine-reactive PEG polymers except SC-PEG-2000 and SC-PEG-5000. Competition ELISA demonstrated excellent retention of apparent binding affinity ( $K_d$ ) in representative minimally PEGylated afv proteins as shown in Table 2. The PEG-2000 afv bioconjugates exhibited the greatest difference in apparent  $K_d$  ( $7.5 \times 10^{-9}$ ) when compared to the unmodified CC49 afv ( $4.5 \times 10^{-9}$ ). We have previously reported an increase in apparent  $K_d$  of 2- and 15-fold for glycosylated afv and multiply PEGylated, glycosylated CC49/218 afv, respectively (68). While identification of the most reactive primary amine sites for each individual afv protein and for each individual activated PEG polymer would require peptide mapping and other chemical analyses, the demonstrated capability of randomly attaching one or two polymers to active afv molecules suggests that the lysines within, or very near, the antigen-binding site may not be the most reactive moieties using these reaction conditions.

本複製物は、著作権が著作権者または著者等の規定により複製されたものです。  
取扱いにあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

PEGylated Single-Chain Fv

Biomacromol. Chem., Vol. 10, No. 3, 1999 977

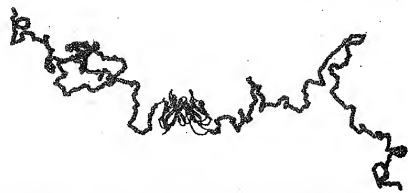


Figure 2. Molecular model of PEGylated V<sub>H</sub> linker-V<sub>L</sub> 4-4-20212 sFv. The PEG-12000 polymers attached to surface lysines L112 (blue) and H78 (red) are shown as yellow CPG models. The 4-4-20212 sFv is shown as a ribbon diagram, with the light chain in blue, the linker in orange, and the heavy chain in red. The figure was produced using MolScript (65) and RasMol (66).

Table 1. Exposure Patterns of CDR and Framework Residues in 34 Fv Structures\*

amino acid	Bs	mB	pB	mB	Ex	total
CDR residues						
lysine	0	5	13	32	29	79
aspartic acid	14	21	21	28	37	121
glutamic acid	7	8	10	12	8	45
framework residues						
lysine	9	11	39	128	109	290
aspartic acid	35	13	22	45	89	203
glutamic acid	20	4	27	82	50	183
total	100	60	142	337	236	864

\* Data adapted from compilation by Padlan (74) for 34 human and mouse Fv regions of known three-dimensional structures, which were analyzed for fractional solvent accessibility of residues within CDR and framework sequences. The five categories of relative solvent exposure are defined from the following range of fractional accessibility values: 0.00–0.10, completely buried (Bs); 0.10–0.40, mostly buried (mB); 0.40–0.50, partly buried/partially exposed (pB); 0.50–0.80, mostly exposed (mE); ≥0.80, completely exposed (Ex).

```

DYVVGSGTSLVIVGKVTSLGLISGLISLVKSNKRLV 39
CDR1
AIVGQVFQDPELLIVKASASLIGVPPVTFGGSGTDT 38
CDR2
LIISSVSDGLAVVCCGYGYSYSLTIDGATSLVLKGLIF 119
CDR3
ISDFGSGDTDFGQVQLQDGLLFLVFAKDTCKLTASD 120
CDR4
YTFSLISLVGVGHPVQGLNLTSLVGLKGRKSLKDFP 118
CDR5
DEATLAKSLISITAVQLNLTSLFEDVAVTSLTSLKAL 245
CDR6
WDGSLVTVS 246

```

Figure 3. Amino acid sequence of CC49/218 sFv protein. Lysine (K) residues are indicated (K). The amino acids aspartic acid (D) and glutamic acid (E) are also highlighted (E). CDR sequences are underlined and the 218 linker is in italics.

Carboxyl-Reactive PEGylation and Branched PEG. Charged amino acid residues, including lysine, aspartic acid, and glutamic acid, have a marked tendency to be solvent accessible on protein surfaces (Table 1). Conjugation to carboxylic acid groups of proteins is a less

frequently explored approach for production of protein bioconjugates. However, the hydrazide/EDC chemistry described by Zallpety and colleagues (16, 33) offers a practical method of linking PEG polymers to protein, carboxylic sites. For example, this alternate conjugation chemistry has been shown to be superior to amine linkages for PEGylation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) while retaining biological activity (38). Macdonald and colleagues have also found carboxyl-targeted PEGylation to be the preferred approach for fibrinolytic enzyme conjugations (39). Two significant observations from our investigations of the conjugation reactions of Hs-PEG-5000 with CC49 sFv are as follows: (a) the employment of much higher PEG concentrations in the PEGylation reactions was possible in generation of active PEG-sFv compounds and (b) the retention of antigen-binding activity in PEG-sFv compounds was possible with increased numbers of PEG polymers on the bioconjugates. Specifically, antigen-binding activity was lost by PEGylation of CC49 sFv with a 14-fold or greater molar excess of activated PEG polymer using any of the amine chemistries with straight-chain polymers; whereas the activity was well preserved when the SC-PEG per sFv molar reaction ratio was below 4. An exception to this rule occurred for the branched SC-activated PEG U-PEG for which PEG:sFv reaction ratios of 14 produced a predominantly non-PEGylated sFv compound (Figure 4, panels C and D) that demonstrated an equivalent apparent affinity when compared to the unmodified sFv. These results illustrate the influence of steric factors in the reaction rates of the polymer conjugation. The development of U-PEG by Greenwald and colleagues (39) has provided significant geometric adaptability for PEGylation strategies, and is shown here to substantially modulate the reaction kinetics of conjugation as well.

In contrast to the linear maline-reactive PEG polymers, PEGylation reactions employing a 200-fold molar excess of Hs-PEG-5000 relative to sFv protein were demonstrated to produce active PEG-sFv compounds with an average PEG number of 4.8 (Figure 4D and Table 3). Although this Hs-PEG-sFv preparation displayed a 10–15-fold diminished binding affinity by competition ELISA, the retention of significant antigen-binding activity in

本誌原稿は、発行所が著作権法第4条第2項第1号の規定により複製したものです。  
取組にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

978 *Synorganic Chem.* Vol. 10, No. 6, 1999

Lee et al.

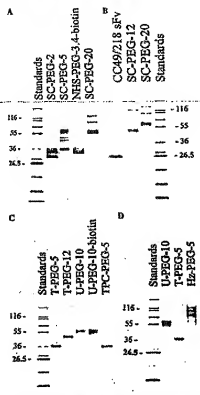


Figure 4. SDS-PAGE analysis of PEGylated CC49/218 sFv conjugates. Chemicals blue stained proteins and conjugates were analyzed by 4–20% SDS-PAGE. Unlabeled standard markers ( $10^3 \times 10^{-3}$ ) within the Novex Mark12 series (Experimental Procedures) are unmodified CC49/218 sFv (9.5), lactate dehydrogenase (95), glutamic dehydrogenase (55), and  $\beta$ -galactosidase (116). (A) SC-PEG-2000, SC-PEG-5000, NIS-PEG-3400-biotin, SC-PEG-20000. (B) CC49/218 sFv, SC-PEG-12000, SC-PEG-20000. (C) T-PEG-5000, T-PEG-12000, U-PEG-10000, U-PEG-10000-biotin, TFC-PEG-5000. (D) U-PEG-10000, T-PEG-10000, Hz-PEG-5000.

Table 2. Dissociation Constants ( $K_d$ ) of sFv Components

sFv formulation	PEG:GpV*	$K_d$ ( $10^{-6}$ M)
active CC49/218	0	4.5
SC-PEG-2000	2.1	4.6
NIS-PEG-3400-biotin	2.0	6.1
SC-PEG-12000	1.3	9.8
SC-PEG-20000	1.1	7.5
T-PEG-5000	1.0	7.0

\*Ratio of PEG polymer per sFv.

this moderately PEGylated sFv provides a very attractive alternative conjugation strategy which may be employed when amine chemistries are not suitable. Remarkably,

Table 3. Pharmacokinetics of sFv and PEG-sFv Conjugates

sFv construct			circulating half-life (h)	area under the curve (ng h/mL)		mean residence time (h)	
MW	linker	inhib	sFv	end	std	mean	std
CC49/218 sFv			0	0.7	0.4	54	77
5000	SC		2.1	3.6	0.4	135	13
3400	NIS	biotin	2.0	2.5	0.4	85	14
5000	T		1.0	1.6	0.4	67	14
5000	SC		1.7	4.1	1.0	147	32
5000	TTC		1.4	2.4	1.0	120	28
5000	Hz		4.5	9.8	1.6	385	58
10000	U biotin		1.5	10.4	1.3	415	47
12000	T		1.2	33.0	1.7	553	64
12000	SC		1.3	83.2	1.5	598	58
20000	SC		1.1	82.8	0.7	1110	56

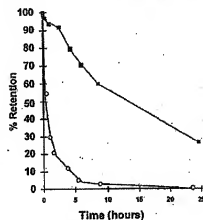


Figure 5. Pharmacokinetics of plasma retention of CC49/218 sFv and SC-PEG-20 conjugate. Plasma retention studies of the unmodified sFv (open circles) and the PEGylated conjugate (filled circles) were performed in mice (six per group) as described in Experimental Procedures.

SE-HPLC purified, Hz-PEG-5000-modified sFv compounds with PEG numbers as high as 11 demonstrated detectable antigen-binding activity (data not shown). The observed capacity of carboxyl-directed conjugations of the sFv protein to preserve binding activity at higher PEG numbers plausibly correlates with the location for the most reactive moieties in this category at sites distal to the CDRC. In this connection, surface exposure of carboxyls is not as predominant as for lysines in Fv structures (Table 1). Ultimately, Hz-PEG polymers of higher molecular weight and/or with branched U-PEG geometry may provide further benefits. Since the  $V_L$  and  $V_H$  immunoglobulin families have inherent sequence variability, the availability of alternate conjugation



本製剤物は、特許庁が特許権を第4,852,828号の発明により特許したものです。  
取扱いにあたっては、特許権侵害とならないよう十分にご注意ください。

PEGylated Single-Chain Fv

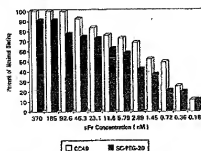


Figure 6. ELISA showing antigen binding of CC49218 sFv (open bars) and SC-PEG-30 conjugate (filled bars) using 1.5, 17.1, 171, and 1,717 ng/ml sFv concentrations. Control compounds (10 ng/ml) BSA and 4-4-20 sFv did not exhibit binding activity. Each starting sFv compound was analyzed in 1:2 serial dilutions.

chemistries provides the antibody engineer with options for construction of individual PEG-sFv immunomolecules. The eventual biochemical characterization of therapeutic PEG-sFv lead candidates with regard to the specific

*Biotechnology Biochem. Vol. 10, No. 6, 1995 379*

residue modifications and degree of heterogeneity will provide a more detailed understanding of these bioconjugates.

**Circulating Lives of PEGylated sFv.** Table 3 presents the pharmacokinetic profiles of 10 PEGylated sFv compounds which differ in linker chemistry, polymer length, and polymer geometry. Included in Table 3 is the estimated stoichiometry (PEG/sFv) in these compounds. Each of these minimally modified preparations demonstrated an average PEG number ( $n$ ) of  $1.0 \pm n \pm 2.1$  except the 18-s-PEG-sFv conjugate. Groups of six mice were injected intravenously with unmodified CC49218 sFv or one of the PEGylated sFv compounds, and circulatory half-life, area under the curve (AUC), and mean residence time were calculated using a one compartment model as described in Experimental Procedures. Unmodified sFv protein cleared rapidly from the plasma with a circulating half-life of  $0.7 \pm 0.4$  h. Renal clearance has previously been established as the predominant, if not exclusive, mechanism responsible for sFv protein elimination (35, 37). All PEGylated sFv compounds demonstrated markedly increased circulating lives which extended the  $t_{1/2}$  values from 2.6-fold (T-PEG-SX00) up to 20.3-fold (T-PEG-12003). These significant observations may be drawn from these pharmacokinetic data. First, PEGylated sFv compounds having both similar PEG numbers and polymer sizes also had similar circulating lives.

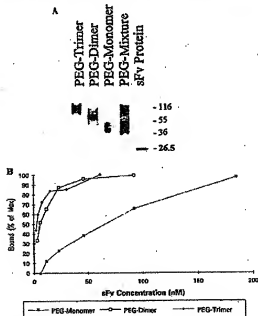


Figure 7. Production and functional affinity of multivalent cross-linked PEG-sFv compounds. (A) Purified CC49218 sFv compounds corresponding to monomer, dimer, and trimer valencies were generated with hexanediol-thiol cross-linking (SC-PEG-SX00) and analyzed on Coomassie blue stained SDS-PAGE 8–20% slab gels. The initial product mixture of the PEGylation reaction is also shown. (B) ELISA of monomer, dimer, and trimer PEG-sFv compounds for mean-binding activity versus sFv protein concentration.

本底製剤は、特許庁が特許法第42条第2項第1号の規定により採出したものである。  
 取扱いにあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

268 Biocognitive Chem., Vol. 10, No. 6, 1999

Lee et al.

Second, the employment of PEG polymers of longer lengths extended circulating lives to a greater degree than multiple shorter polymers of equivalent total mass. For example, Ho-PEG-6000-sFv with a PEG number of 4.8 exhibited a  $t_{1/2}$  of  $9.8 \pm 1.8$  h, while SC-PEG-20000-sFv with a PEG number of 1.1 demonstrated a  $t_{1/2}$  of  $12.8 \pm 0.7$  h. Third, the extension of AUC by as much as 20-fold, such as in the SC-PEG-20000-sFv compound, without substantially compromising sFv antigen-binding activity, bodes well for the potential of PEGylation by systematically extending the bioavailability of sFv protein therapeutics. Figure 5 shows the blood clearance kinetics of the PEG-20000-sFv compound, and Table 2 includes the calculated  $K_d$  for this compound for the validated surrogate antigen, bovine subcutaneous mucin. As an independent confirmation of binding activity for this compound to the tumor-associated mucin target, a modified ELISA analysis of equilibrium binding using the TAG-72-expressing 17C-11 osteosarcoma cell line with the tumor antigen was performed as previously described (33). As shown in Figure 6, the PEG-20000-modified sFv also maintained specific cell-binding activity comparable to the unmodified sFv protein.

In the context of our observations on the benefits of employing PEG polymers of longer length, as opposed to multiple short-chain conjugations, we anticipate that clearance rates for succeeding sFv bioconjugate formulations may be further optimized. The overall selection of PEG modifications will ultimately relate to the individual targeting goal for the sFv, and verification of PEG-sFv efficacy can only be fully validated by *in vivo* studies. Although the attached polymers may have a temporal influence on the rapid tissue penetration of sFv proteins, the described "enhanced permeability and retention effect" (40–43) of polymers such as PEG may provide interesting dual targeting modalities utilizing both passive (PEG) and active (sFv) targeting strategies for tumors or other tissues.

**PEGylated Multivalent sFv.** Multivalency is another intrinsic property of natural human antibodies of any class. Recent success in engineering multivalent and multifunctional forms of sFv proteins (1, 9–12, 44) has established the single-chain Fv format as a comprehensive antibody technology. Consequently, multivalent Fv may also be engineered through polymer-based bioconjugates, which stimulate the functional affinity advantages of multivalency for repetitive epitopes. In a pilot study to evaluate the valency and activity of multimeric PEG-cross-linked sFv proteins, we utilized a bifunctional PEG-5000 polymer having activated SC moieties (BSC-PEG) on both termini of the linear strand (38). Our selected reaction conditions did not produce substantial amounts of PEG-sFv monomers, and multimeric PEG-sFv (PEG-sFv) could be readily purified from monomeric sFv forms by Superdex 75 chromatography. As with most hemifunctional repeat linkages, the cross-linked sFv proteins are expected to be heterogeneous with regard to valency (i.e., dimers, trimers, and tetramers) and also with respect to surface linkage sites. However, for antigen-binding molecules such as CC9 sFv which recognizes a repetitive Stx17 epitope on mucin, a parameter which may be investigated in formulations of cross-linked sFv is the relative degree of functional affinity in these compounds. Two SE-HPLC fractions of PEG-sFv were isolated, which, according to molecular mass estimates, correspond to dimeric and trimeric sFv species. Monomer, dimer, and trimer are defined here as having either one, two, or three sFv proteins, respectively, incorporated in the heterogeneous PEGylated

conjugates. Figure 7A shows the SDS-PAGE analysis of these preparations. As described in Experimental Procedures, a solution-binding assay was developed to compare the relative functional affinity of the monomeric SC-PEG-5000-sFv and multimeric PEG-sFv compounds. As shown in Figure 7B, a marked increase in apparent affinity was observed in the PEG-sFv conjugates when compared to the PEG-sFv monomer. A comparable increase in apparent affinity was previously reported in immunosensitization of the dimeric CC9 sFv male when compared to the monovalent CC9 sFv (10, 20). Further improvements of this approach may be anticipated by employing site-specific bifunctional activated PEG polymers of selected length to achieve well-defined cross-linked sFv protein compounds, which may be highly adjustable with respect to the critical crosslinking life parameters.

In conclusion, we report the applicability of established random PEGylation procedures for generating highly active PEG-sFv compounds exhibiting substantial extensions of circulating lives in mice. The potential to create designed antigen derived drugs with tailored pharmacokinetic properties provides numerous practical applications in immunotherapy.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Jung Der Yang, Anna Neyerich, and Masahiko Wang for technical assistance in the ELISA data collection and the purification of bioconjugates. We are also grateful to Jeff McCullin, Jo Boesman, Ruth Greenwald, Kwok Shum, and Chai Lee for support and helpful discussions on PEGylation and pharmacokinetic analysis.

#### LITERATURE CITED

- Hudson, P. J. (1993) Recombinant antibody fragments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4, 395–402.
- Dahl Aquino, W., and Carter, P. (1994) Antibody engineering. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 445–450.
- De Haard, H., Hendriks, E., and Hoogenboom, H. R. (1998) Creating and engineering human antibodies for immunotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 31, 5–21.
- Filipita, D., and McClure, J. (1999) Single-chain Fv designs for protein, cell, and gene therapeutics. *Exp. Opin. Ther. Patents* 9, 231–245.
- Kreitman, R. J., and Pastan, I. (1998) Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 31, 53–68.
- Pelgrin, M., Martin, M., Neel, D., and Pichon, M. (1999) Genetically engineered antibodies in gene transfer and gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 6, 2165–2175.
- Begent, R. H. J., Verhaeg, M. J., Chentier, K. A., Camp, J. L., Green, A. J., Napier, M. P., Hope-Stone, L. D., Cashen, N., Keay, P. A., Johnson, C. J., Harwood, R. R., Hixon, A. J. W., and Roberts, L. (1998) Clinical evaluation of different tumor targeting based on single-chain Fv antibody selected from a combinatorial library. *Nat. Med.* 4, 979–984.
- Frish, J. G., Kishimoto, J. A., Hinder, H. M., Mott, L. A., Evans, M. J., Rollins, S. A., Alford, B. L., and Hixon, R. L. (1996) Selective pharmacokinetics and immunogenicity of intravenous administration of HGG1-5C9Fv in humans. *Blood* 88, 5546.
- Hidiger, P., Wong, M., Paudyal, D. D., Bollen, H., and Winter, C. (1997) Designing serum immunoglobulin with bispecific disulfides. *Nat. Biotechnol.* 15, 632–635.
- Whitney, M., Filipita, D., Rollins, M. L., Peng, S. J., and Wood, J. F. (1994) Multivalent Fv: characterization of single-chain Fv oligomers and preparation of a bispecific Fv. *Protein Eng.* 7, 1011–1020.
- Adams, G. P., Schier, R., McCall, A. M., Crawford, R. S., Wake, E. J., Vukob, I. M., and Marko, J. (1998) Protein in vivo tumor retention of a human antibody targeting the extracellular domain of human HER2/neu. *Br. J. Cancer* 77, 1405–1412.

本雑誌物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。  
取扱いにあつては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

## PEGylated Single-Chain Fv

## Biospecific Chem, Vol. 10, No. 6, 1999 681

- (12) Wang, D., Berens, E., Li, Q., Uchida, P., and Kersley, J. H. (1997) Optimization of a linker for location analysis of anti-CD19 FVS101 single-chain Fv homodimer (scFv). *Bioconjugate Chem.* 8, 64-70.
- (13) Cao, Y., and Savelle, M. E. (1998) Bispecific antibodies as novel bioconjugates. *Bioconjugate Chem.* 9, 535-544.
- (14) Nuzzi, M. L., Sherr, R., and Albrechtson, (1992) The therapeutic value of polyethylene glycol-modified proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 6, 133-151.
- (15) Francis, G. E., Delgado, C., Fisher, D., Malik, F., and Agrawal, A. K. (1996) Polyethylene glycol modification: Relevance of improved methodology to tumor targeting. *J. Drug Targeting* 3, 321-340.
- (16) Zalkovsky, S. (1995) Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates. *Bioconjugate Chem.* 6, 159-165.
- (17) Clark, R., Oram, R., Fuhs, G., Martin, M., Murtomaa, D., Tschibana, G., Cheng, S., Cho, H., Mukita, Y., Casares-Davila, R., Swane, T., Crowin, M., Winkler, M., and Wells, J. A. (1998) Long acting growth factors produced by conjugation with poly(ethylene glycol). *J. Biol. Chem.* 273, 21969-21977.
- (18) Pustit, D. R., Burnett, T. P., Elzenbaum, J., Schreiner, S., Focant, J., Suena, G., Lynch, D., Miller, B., Yee, J., Galsztain, K. H., and Gosteva, W. R. (1997) Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, poly(ethylene glycol) conjugation, and homology modeling. *J. Biol. Chem.* 272, 2312-2318.
- (19) Dillipathi, C., Polley, R. B., Herrera, A., Dodson, R., Bostan, J. A., Keop, P. A., Cleaver, K. A., Fisher, D., Beggs, R. H. J., and Francis, G. E. (1998) Enhanced tumor specificity of an anti-mucin-1 antibody antigen Fc $\gamma$  fragment by poly(ethylene glycol) (PEG) modification. *Int. J. Cancer* 78, 175-182.
- (20) Benhar, I., Benhar, I., Benhar, I., Wubb, R. G., and Pastan, I. (1994) Mutations of two tyrosine residues in the CDR loops of a recombinant immunoglobulin that reduce its sensitivity to chemical derivatization. *Bioconjugate Chem.* 5, 321-328.
- (21) Benhar, I., Wang, Q.-C., Pin-Gerold, D., and Pastan, I. (1994) Pseudomonas aeruginosa A mutants. Replacement of surface-exposed residues to ornithin III with tyrosine residues that can be modified with poly(ethylene glycol) in a site-specific manner. *J. Biol. Chem.* 269, 13398-13404.
- (22) Wang, Q.-C., Pin, L. L., Delgado, W., Pin-Gerold, D., and Pastan, I. (1993) Poly(ethylene glycol)-modified dimeric tumor composed of transforming growth factor alpha and Pseudomonas aeruginosa. *Cancer Res.* 53, 4558-4564.
- (23) Kline, O. B., Burns, D. N., Larsen, S. L., Paip, A. C., Humberg, J. B., and Treichel, K. L. (1994) Characterization and stability of N-terminally FEG-ylated hCG-CSF. *Pharm. Res.* 11, 996-1002.
- (24) Paulsen, S. A. (1994) The structure of antibodies. *Molecular Biology Intelligence Unit: Antibody-antigen complexes*, pp. 17-30. R. G. Landry Company, Austin, TX.
- (25) Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., and Feiler, C. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. 5th ed., U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda, MD.
- (26) Wang, M., Lee, L. S., Hopewell, A., Yang, J.-D., Connor, C., Whitlow, M., and Filipek, D. (1996) Single-chain Fv with modified N-glycans as functional vaccines. Conjugation of bovine hemoglobin. *Protein Eng.* 11, 1277-1283.
- (27) Filipek, D., McGinty, J., and Whitlow, M. (1996) Production of single-chain Fv monomers and multimers. In *Antibody Engineering: a Practical Approach* (J. McCafferty, H. R. Hogben, and D. J. Chiswell, Eds.) pp. 253-268. Oxford University Press, Oxford.
- (28) Csernok, E. B., Pustit, A., Morthen, A., Gilbert, C., and Bratley, P. (1998) FEG dithiolimide 2-chole, a novel reagent for lipo protein modification. Conjugation of bovine hemoglobin. *Bioconjugate Chem.* 9, 635-641.
- (29) Murtomaa, A., Pustit, A., Xu, J., and Csernok, E. B. (1997) Branched poly(ethylene glycol) blocks. *Macromol. Chem. Phys.* 198, 2439-2448.
- (30) Hecmann, C. T. (1996) Modification with synthetic polymers. *Bioconjugate Chemistry*, pp. 605-618. Academic Press, San Diego, CA.
- (31) Whitlow, M., Bell, B. A., Feng, S.-L., Filipek, D., Hardman, E. D., Huber, S. J., Bollman, M. J., Wood, J. P., Schott, M. E., Mitten, D. E., Yokota, T., and Schonen, J. (1993) An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Eng.* 6, 989-995.
- (32) Huber, A. P. S. A. (1994) Determination of free amino groups in proteins by carboxybenzylsuccinic acid. *Anal. Biochem.* 216, 359-368.
- (33) Zalkovsky, S., and Mones-Rudolph, S. (1997) Hydroxide derivatives of poly(ethylene glycol) and their bioconjugates. In *Poly(ethylene Glycol) Chemistry and Biological Applications* (J. M. Harris and S. Zalkovsky, Eds.) pp. 318-341. American Chemical Society, Washington DC.
- (34) Herlow, R., and Lane, D. (1988) Immunospacer. *Antibodies: a Laboratory Manual*, pp. 553-612. Cold Spring Harbor Laboratory, Plainville, NY.
- (35) Miloski, D. E., Yokota, T., Filipek, D. R., Finkelman, M. A., J. Duda, S. W., Wood, J. F., Whitlow, M., Stoy, P., and Schonen, J. (1991) Construction, blocking properties, immunization, and tumor targeting of a single-chain Fv derived from the pancreatic monoclonal antibody CC49. *Cancer Res.* 51, 6365-6371.
- (36) Friguet, B., Chiffolleau, A. F., Djabat-Cherouin, and Collobert, M. E. (1993) Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* 17, 369-319.
- (37) Larsson, S. M., El-Shirbiny, A. M., Ding, C. R., Sgouras, G., Finn, R. D., Tschinkel, J., Finn, A., Whitlow, M., Schonen, J., Zhang, J., and Cohen, A. M. (1997) Single chain antibody binding protein (scFv-CC49). First human studies in advanced carcinoma metastatic to liver. *Cancer Res.* 57, 2458-2468.
- (38) Wu, D., and Fawcett, W. M. (1998) Neuroprotection with nanoscale neurotrophin delivery to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 254-258.
- (39) Maeda, H., Kimura, M., Suzuki, I., Hirose, Y., and Kometani, T. (1992) Tumor of biliverdin and dithiolimide by PEG-bilirubin adduct conjugates. In *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biomedical and Biomedical Applications* (J. M. Harris, Ed.) pp. 153-169. Plenum Press, New York.
- (40) Maeda, H., and Murtomaa, Y. (1989) Tumorotropic and lymphotropic properties of macromolecular drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6, 199-210.
- (41) Maeda, H., Segman, L. W., and Miyamoto, Y. (1995) Conjugates of anticancer agents and polymers: advantages of macromolecular therapeutics in vivo. *Bioconjugate Chem.* 6, 351-362.
- (42) Maruyama, Y., Yokota, Y., and Maeda, Y. (1997) Tumor accumulation of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous injection. *Drug Deliv.* 4, 25-31.
- (43) Maruyama, Y., Weinleider, R., and Segman, L. W. (1998) Antibody-mediated versus nonantibody delivery in a human small cell carcinoma model. *Bioconjugate Chem.* 9, 184-191.
- (44) Simons, N. O., Kerr, D. B., Yarnold, S., Scobbin, M. R., Virelizier, Y. M., Hollinger, L., McArthur, K. E., and Senter, P. D. (1990) Construction, expression, and activation of L40-sFv-antigen, a single-chain antibody fusion protein for the anticancer pro-drug activation. *Bioconjugate Chem.* 1, 519-518.
- (45) Kreslitz, P. J. (1990) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 848-855.
- (46) Merritt, E. A., and Bacon, D. J. (1997) Raster3D: Photo-realistic molecular graphics. *Methods Enzymol.* 277, 505-532.

BC950604

本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。  
取扱いにあたっては、著作権者等としないよう十分にご注意ください。

Protein Engineering vol.11 no.12 pp.1277-1283, 1998

## Single-chain Fv with manifold N-glycans as bifunctional scaffolds for immunomolecules

Mouliang Wang, L. Stanford Lee, Anna Nepemich, Jeag-Dar Yang, Charles Conover, Marc Whitlow and David Filipski

Danisco, Incorporated, 20 Klingenberg Road, Piscataway, NJ 08854-3969, USA

To whom correspondence should be addressed

Unlike natural antibodies, single-chain Fv (scFv) proteins normally lack asparagine-linked glycosylation. Many designed immunomolecules and other therapeutics currently employ the advantageous conjugation chemistry or targeting properties provided by the glycoprotein oligosaccharide domain. scFv proteins with engineered N-glycan designs were evaluated in *Pichia pastoris* for glycosylation efficiency, expression level, oligosaccharide chain length and composition, and affinity. In contrast to nearly all natural glycoproteins, the engineered attachment of N-glycans conveniently near the polypeptide C-terminus was found to produce the optimal results. Furthermore, the percentage modification and chain length of the attached mannose chains were controllable by the use of tandem and overlapping Asn-X-Tripeptide sites. The glycosylated scFv mannose chains could be effectively conjugated to polyethylene glycol and the resulting conjugate displayed a 10-fold increased circulating life in mice. The potential to control polymer-scFv or drug-scFv molecular ratios by site-specific conjugation may substantially improve the therapeutic efficacy of these minimal antigen-binding molecules. **Keywords:** Polyglycosylation/Pichia/polyethylene glycol

### Introduction

The engineering advantages provided by the single gene, single polypeptide design of single-chain Fv proteins have increasingly made scFv proteins the antigen-binding format of choice for antibody engineers (Bogdan *et al.*, 1986; Fournier, 1997; Hoogenboom, 1997). More recently, there have been several engineering advances which attempt to combine the efficacy, avidity or pharmacological properties of intact monoclonal antibodies with the simplicity of scFv proteins (Wattlow *et al.*, 1994; Filipski *et al.*, 1996; Holliger *et al.*, 1997; Koeterman *et al.*, 1997). For example, multivalency may be engineered in multimeric scFv. The neutral effector functions of whole antibodies may be either attached in scFv/Fc fusion proteins or recruited by bifunctional scFv molecules. Pharmacological properties such as circulating half-life are similarly influenced by scFv protein format. Meanwhile, the affinity maturation of natural antibodies by somatic mutation has been surpassed by *in vitro* CDR mutagenesis and phage display methods that have produced high affinity specificities to virtually any antigen (Meyers and Marks, 1996).

Another property of natural IgG antibodies which has been useful in the development of immunomolecules is the presence of N-linked glycosylation on the CH<sub>2</sub> domain. The oligosac-

charide chains of IgG have been preferred conjugation sites for drugs and other molecules in the development of antibody based therapeutics (Rowell *et al.*, 1986; Leung *et al.*, 1995). Beyond immunoglobulins, protein glycosylation is often a critical factor in determining pharmacokinetics and biodistribution. For example, mannose-terminated proteins or drugs may be targeted to cells of the reticuloendothelial system (Beynon, 1994). N-linked glycosylations have been reported to occur sporadically at non-conserved positions within the framework on hypervariable regions of several natural antibodies and may influence antigen-binding properties (Wright and Morrison, 1997). However, the use of glycosylated scFv proteins as therapeutic agents will only be of practical application if it meets the following criteria. First, the glyco-scFv must be expressed in high yield, and preferably secreted from a microbe. Second, the oligosaccharide attachment events must be efficient such that little unmodified scFv is produced. Third, scFv antigen-binding affinity should be preserved and the N-linked site should be distal to the antigen-binding site. Fourth, the attached oligosaccharide should be relatively homogeneous and have a composition suitable for conjugation or biological recognition processes. Fifth, the chain length of the oligosaccharides should ideally be adjustable to provide versatility in design.

Using the model single-chain Fv, CC49/218 scFv, we have engineered glyco-scFv proteins expressed from the yeast *Pichia pastoris* which meet each of these criteria. High-level expression of unmodified scFv in *P. pastoris* has been reported previously (Ridder *et al.*, 1995; Eldin *et al.*, 1997; Leo *et al.*, 1997). Surprisingly, attachment of N-linked core glycosylation very near the C-terminus proved to be the most desirable overall strategy. Further, our unexpected discovery that tandem and overlapping N-X-T sequence resulted in the appearance of extended mannose chains provided glyco-scFv molecules with multiple potential conjugation sites for polymers and drugs at positions which are both diametrically opposed to the antigen-binding site and physically removed from the Fv architecture.

### Materials and methods

#### Materials

The gene for CC49/218 scFv was obtained from the Eiken plasmid pC3568. The complete DNA sequence of CC49/218 scFv has been reported (Filipski *et al.*, 1996).

Oligonucleotides were synthesized using a Millipore Cyclone DNA Synthesizer. Invitrogen (San Diego, CA) supplied *P. pastoris* hosts and vectors. The GlycoTrack Carbohydrate Detection Kit, Endo-glycosidase II, Peptide-N-glycosidase F,  $\alpha$ -mannosidase (jack bean),  $\alpha$ -mannosidase (*Aspergillus* sp.) and  $\beta$ -mannosidase were purchased from Oxford GlycoSystems (Roseland, NJ). Digoxigenin-labeled host RNA was obtained from Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). Pre-cast polyacrylamide slab gels (4–20%) were obtained from Novex (San Diego, CA). Bovine submaxillary mucin type 1 was purchased from Sigma (St Louis, MO). Superdex 75 and



本複製物は、特許庁が著作権法第23条第2項第1号の規定により複製したものです。  
 複製にあたっては、著作権保護とならないよう十分にご注意ください。

Digoxigenin-labeled *Galensius sialis* lectin GNA was used according to the supplier's instructions (Boehringer Mannheim).

#### Binding of glyco-sFv to Con A Sepharose

A 1 ml amount of Con A Sepharose resin in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 M NaCl) was incubated with 50  $\mu$ l of dialyzed EN235 culture supernatant. The beads were pelleted by microcentrifugation and the supernatant was removed. Elution of bound glyco-sFv was performed by washing the resin with binding buffer containing 0.2 M  $\alpha$ -methylmannoside.

#### ELISA for sFv binding activity

Immunosorbent procedures were performed using modifications of previously published protocols (Milenic et al., 1991; Whitlow et al., 1994). Bovine submaxillary mucin (250 ng per 100  $\mu$ l well) antigen was used to coat microliter plate wells (MaxiSorp, Nunc, VWR Scientific, Boston, MA). The glyco-sFv or purified CC49/218 sFv proteins were diluted serially in PBS containing 1% BSA and incubated in the coated wells at 22°C for 1 h. After the plate had been washed with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T), the bound sFv was detected by a 1 h incubation with a secondary antibody (mouse anti-CC49/218), followed by a PBS-T wash and a 1 h incubation with an alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody. Signal generation was performed using PNPP as described by Harlow and Lane (1988). The plate was read at 405 nm using a Molecular Devices (Sunnyvale, CA) plate reader. In a reverse ELISA method, rabbit anti-CC49/218 sFv (1:2000 dilution) and HRP-conjugated goat anti-rabbit serum (1:2000 dilution) were successively incubated at 37°C for 1 h. The plates were washed three times with PBS-T and were read at 450 nm following addition of 100  $\mu$ l of 3',3',5',5'-tetramethylbenzidine (TMB).

#### Competition ELISA

The apparent affinity constants ( $K_d$ ) of the glyco-sFv variants were determined using biotin-labeled CC49/218 sFv in competition immunoassays as reported previously (Milenic et al., 1991; Whitlow et al., 1994).

#### Purification of glyco-sFv

Purified glyco-sFv was oxidized with sodium periodate, conjugated to PEG5000-biotinamide and reduced with NaCNBH<sub>3</sub> as described previously (Zalipsky et al., 1997). Polystyrene glycol-conjugated glyco-sFv was purified by size-exclusion HPLC.

#### Circulating life in mice

Pharmacokinetics of sFv and sFv conjugates were measured in ICR (CD-1) 7-8-week-old female mice supplied by Harlan Sprague Dawley (Madison, WI). A single intravenous injection of 60  $\mu$ g of glyco-sFv protein was performed via the tail vein. After compound administration, sampling of blood (100  $\mu$ l) via the retro orbital sinus was undertaken following anesthetization with 0.02% Avertin. Blood was allowed to clot and then processed for serum and immediately frozen. The concentrations of the modified sFv were measured by ELISA. The circulatory half-life, area under the curve and mean residence time for the sFv proteins were calculated using a one-compartment i.v. bolus model (WinNonlin software package, Scientific Computing, Apex, NC). The correlation between the observed and predicted model time point values was >95%.

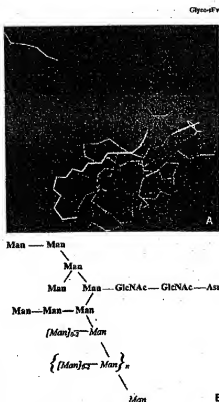


Fig. 1. Structural model for sFv protein and N-linked core and outer mannose chains. (A) The V1-linker-V2 sFv model is based on the 4-4-20 anti-Idomycin Fab crystal structure and includes a postscript Coreman extension (pink). The V1 is shown in red, the V2 in blue, the 218 linker in yellow and the antigen in white. (B) A structural model for the Man-GlcNAc core structure of a 218 sFv. The structure shows a Man-GlcNAc core structure with a 218 linker and a 218 linker. The structure shows a Man-GlcNAc core structure with a 218 linker and a 218 linker.

#### Results

##### Design strategy for glyco-sFv

A structural view of V1-linker-V2 sFv architecture (Whitlow et al., 1993, 1995) and a consensus model of N-glycan high-mannose structure in *Pseudovirus* (Kubicek et al., 1997; Hertzog et al., 1993; Miele et al., 1997) are shown in Figure 1A and B, respectively. The anti-TAG-72 sFv protein CC49/218 (Milenic et al., 1991), which was recently investigated clinically as an imaging agent for metastatic colorectal carcinoma (Larson et al., 1997), was chosen as a model sFv for our investigations of N-linked glycosylations in *Pseudovirus*. Expression of the CC49/218 sFv gene using the vector pIII-S1 produced correctly processed, secreted sFv

本誌創刊以来、特許庁が著作権法第47条第2項第1号の規定により複製したもので、  
取扱いにあたっては、著作権保護とならないよう十分にご注意ください。

M. Wang et al.

protein at about 30–70 mg/l per gene copy number. The CC99/245 sFv purified from *P. pastoris* EN225 and the clinical-grade sFv from *E. coli* GX9251 were found to have equivalent affinity ( $K_d = 3.6 \times 10^{-8}$  M). In order to minimize the potential for N-linked glycans to block sterically the antigen-binding site, our preferred N-linked attachment sites were initially placed in four back loop residues V<sub>112</sub>, V<sub>171</sub>, V<sub>113</sub> and V<sub>482</sub> (Kabat et al., 1991), the second residue of the 218 linker or the C-terminus. Site-directed mutagenesis of one or two codons introduced the tripeptide sequon at each of these locations. However, we found that placement of one N-X-T/S site at these positions resulted in either inefficient glycosylation or poor expression. Likewise, substitution of one or six of these tripeptide sites within one variant protein yielded detectable modifications, but poor yields and heterogeneous products. The best initial results were obtained with the V<sub>112</sub> C-terminal modification (EN235) which placed the N-X-T sequon one residue before the terminal serine (see Table I). In this case, as much as 55% of the expressed sFv contained N-linked core glycans of ~3 kDa as characterized by SDS-PAGE and Western blot analysis using the N-glycosidase Endo-H and PNGase. However, the placement of the single N-X-T tripeptide before a five-residue C-terminal extension (EN292) increased the efficiency of core N-glycan addition to >95% modification (see Table I and Figure 2A). EN292 shake-flask culture expression yields of 70–100 mg/l surpassed those of native EN225 sFv and affinities were not reduced for these purified glyco-sFv proteins. Since the presence of an N-glycan within 4–8 residues of the C-terminus is extremely rare in natural glycoproteins (Gavel et al., 1990), this was an unexpected result; add encouraged us to investigate another rarity in N-glycosylation: the use of tandem or overlapping N-X-T tripeptide sites.

#### C-terminal tandem and overlapping sites

Two and three tandem tripeptide sites of the sequence [N-X-T]<sub>2</sub> or the overlapping design N-N-T-T were investigated either at the sFv C-terminus or within the 218 linker (see Table I). The inclusion of three tripeptide sites (two of which are overlapping) in the C-terminal construct, EN288, resulted in essentially complete sFv modification with undetectable amounts of native sFv as analyzed by Western blots (see Figure 2A). More remarkably, the inclusion of tandem sites was found to induce a form of hyperglycosylation resulting in N-glycan molecular masses of 9–15 kDa as estimated by SDS-PAGE analysis. EN279 (two tandem sites) displays both core modification and extended chain forms. All glyco-sFv variants were quantitatively converted to the native sFv polypeptide by Endo-H or PNGase F N-glycosidase digestions (see Figure 3A). We found that the three-site tandem variant EN293 produced exclusively hyperglycosylated sFv whereas the EN288 products also contained detectable 6 kDa N-glycan products. Perhaps the most surprising result is shown in Figure 2A for EN294. Inclusion of the single two-site overlapping tripeptide sequence N-N-T-T one residue before the C-terminal series produced glyco-sFv products whose N-glycan molecular mass corresponded to ~3 kDa (minor) and 9–15 kDa (major). By Western blot analysis, unmodified sFv was not detectable in the EN294 culture. In contrast, the corresponding one-site variant, EN292, produced exclusively glyco-sFv with a 3 kDa core N-glycan when examined by Coomassie Blue stained SDS-PAGE gels. This delineates a minimal signal (NNTT) for one form of hyperglycosylation in *Pichia*. Of the

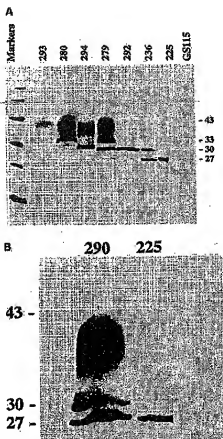


Fig. 2. Western blot analysis of N-linked glycosylation of CC99/245 sFv variants secreted from *P. pastoris*. (A) Glycosylation on C-terminal extensions. (B) Glycosylation on linker. Unmodified sFv protein (27 kDa) and glyco-sFv bearing one (28 kDa) or two (31 kDa) sFv terminus structures (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>) or hyperglycosylated sFv (35–45 kDa) are indicated. Supernatants from the parent *P. pastoris* strain GS115 were also analyzed.

C-terminal glyco-sFv variants examined, lowered expression (<5–10 mg/l) was observed only in EN293. From these empirical results, the practical choice of production of either core N-glycan modified sFv (EN292) or hyperglycosylated sFv (EN280) is achievable with high yields of secreted glyco-sFv (>50 mg/l).

#### Linker tandem and overlapping sites

Inclusion of tandem or overlapping sites at other sFv designed sites was also successful in promoting increased core glycosylation.

本取組物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。  
取組にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

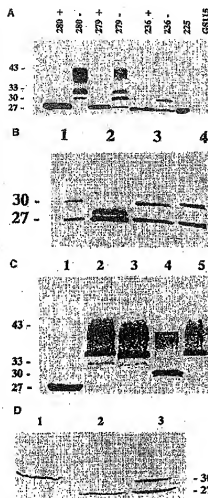


Fig. 3. Digestion of glyco- $\alpha$ Fv protein with N-glycosidase or core-glycosidase and specific binding to IgG1 concanavalin A. (A) Western blot analysis of glyco- $\alpha$ Fv variants and parent virus before (1) or after (2) digestion with Endo- $\beta$ -mannosidase II. (B) Western blot analysis of EN236 before (lane 1) or after digestion with either  $\beta$ -mannosidase (lane 2), jack bean  $\alpha$ 1-2,6-sialidase (lane 3) or asialofetuin  $\alpha$ 1-2,3 mannosidase (lane 4). (C) Western blot analysis of EN236 before (lane 2) or after digestion with either Aspergillus  $\alpha$ -mannosidase (lane 3), jack bean mannosidase (lane 4) or  $\beta$ -mannosidase (lane 5). The unmodified  $\alpha$ Fv, EN225, is shown in lane 1. (D) Coomassie blue stained SDS-PAGE gel with fractions of a CoA A Sepharose batch chromatography performed on EN236 (lane 3) to separate quantitatively the unmodified  $\alpha$ Fv (lane 2) from the glyco- $\alpha$ Fv (lane 1).

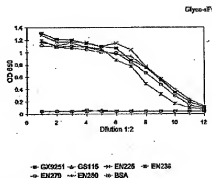


Fig. 4. ELISA of glyco- $\alpha$ Fv culture supernatants from *Pseudomonas fluorescens* expressing mucin-binding activity. The parent virus G6115, CX3251  $\alpha$ Fv purified from *Escherichia coli* CX3251, and BSA (10  $\mu$ g/ml) were included as controls. Each starting  $\alpha$ Fv sample (40  $\mu$ g/ml) was analyzed in 12 serial dilutions.

tion and/or hyperglycosylation. For example, CC49  $\alpha$ Fv with three tandem repeats inserted in the 218 linker produced products containing unmodified, core-modified and hyperglycosylated  $\alpha$ Fv (see Figure 2B). Although these linker modified proteins maintain mucin-binding specificity, expression (secretion) yields were diminished. Indeed, expression of the six tandem NXT linker variant, EN291, produced nearly undetectable yields. The choice of a C-terminal modification seems to be the optimal design by all criteria in our studies.

#### Affinity constants of glyco- $\alpha$ Fv

N-linked glycosylation of CC49/218  $\alpha$ Fv did not significantly affect the binding affinity of the protein as characterized by ELISA or competition ELISA. Figure 4 shows serial dilutions of the dialyzed glyco- $\alpha$ Fv and native  $\alpha$ Fv supernatants analyzed for mucin-binding activity. When the corresponding purified proteins were analyzed by competition ELISA, the greatest difference in apparent affinity was found between the EN225 native  $\alpha$ Fv ( $K_d = 3.6 \times 10^{-8}$  M) and the EN280 three-site glyco- $\alpha$ Fv ( $K_d = 7.3 \times 10^{-8}$  M).

#### Characterization of N-glycans

Unlike mammalian N-glycans, yeast N-linked oligosaccharides have a relatively simple "high-mannose" structure (Herscovics and Orlean, 1993; Miele *et al.*, 1997). *Pichia* N-glycans may be even less complex than those of *Saccharomyces cerevisiae* in that the potentially immunogenic  $\alpha$ 1-3 mannose extensions have not been reported. Typical core glycosylation with Man<sub>4-6</sub>GlcNAc<sub>2</sub> may be further modified by  $\alpha$ 1-6 mannose outer chains which may have  $\alpha$ 1-2 mannose branches (see Figure 1B). However, while "hypermannosylation" is typical in *S. cerevisiae*, these extended mannose chains are not commonly observed in heterologous expression of glycoproteins in *Pseudomonas* (Crugg *et al.*, 1993). We investigated whether the core glycosylated and hyperglycosylated  $\alpha$ Fv proteins conform to this structure by digestion with Endo-H, PNGase F,  $\beta$ -mannosidase, Aspergillus  $\alpha$ 1-2,3 mannosidase and jack bean  $\alpha$ 1-2,6-sialidase. As shown in Figure 3A, all N-glycans were quantitatively removed by N-glycanase Endo-H digestion. PNGase F digestion produced similar results (data not shown). Furthermore, digestion with the jack bean mannosidase, but not the  $\beta$ - or  $\alpha$ 1-2,3 mannosidase, quantitatively converted



本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。  
取扱いにあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

M.Wang et al.

the sFv core N-glycans to a glycoprotein of reduced molecular mass (see Figure 3B and C). Hyperglycosylated sFvs in partially digested by jack bean mannosidase to produce glyco-sFvs of reduced and more homogeneous size (see Figure 3C). These data are consistent with previous reports which indicate that *Pichia* N-linked glycans have a high-mannose composition.

All glyco-sFv proteins could be visualized by the GlycoTinct glycosylation detection method. In addition, digoxigenin-labeled lectin GNA, which recognizes terminal mannose residues of glycoproteins, specifically detected each glyco-sFv form in modified Western blots (unpublished data). Cos A Sepharose quantitatively separated EN235 unmodified sFv (27 kDa) from the glyco-sFv (30 kDa), which was bound and then eluted by  $\alpha$ -D-methylmannoside, as shown in Figure 3D. This is consistent with the  $\alpha$ -D-mannopyranosyl binding properties of this lectin. A complete linkage analysis is necessary to fully define the oligosaccharides. However, the N-glycan molecular masses (see Figures 2A and 3A) conform to the expected structures from yeast as a core N-glycan of ~3 kDa, two core N-glycans of ~6 kDa and extended outer chains with more than 50 mannose residues of ~9–15 kDa.

#### Purification and PEGylation of glyco-sFv

The glyco-sFv proteins were purified by ion-exchange chromatography and size-exclusion HPLC. In order to evaluate the feasibility of using glycosylated sFvs in biocognitive applications, we covalently modified the oligosaccharide chains of the glyco-sFv EN280 with hydrazide-activated polyethylene glycol 5000 (PEG-5000) (Zalpeky and Menon-Rudolph, 1997). The PEGylated product was purified by ion-exchange and size-exclusion HPLC. Unmodified glyco-sFv was completely removed and the approximate PEG:sFv molar ratio was calculated as 3–4 PEG polymers per sFv in the purified fraction used for subsequent *in vivo* studies. The apparent affinity constant of the PEGylated protein was reduced about 6-fold compared with EN280. This may be the result of enthalpic reaction conditions rather than the effect of steric hindrance of the antigen-binding site by the PEG polymers in the competitive ELISA. However, as a result of an enhanced circulating life and reduced immunogenicity, PEGylated proteins often display improved efficacy *in vivo* despite reduced specific activity (Nisici et al., 1991; Delgado et al., 1995; Ene-Ancușescu et al., 1996).

#### Circulating life of glyco-sFv and PEG-glyco-sFv in mice

Groups of five mice were injected intravenously with unmodified CC49218 sFv, EN280 glyco-sFv or PEGylated EN280 glyco-sFv and circulating half-life, area under the curve (AUC) and mean residence time were calculated as described in Materials and methods. As shown in Figure 5, the glyco-sFv displayed a very short serum half-life. The 2-fold faster elimination rate of the glyco-sFv ( $t_{1/2} = 0.39 \pm 0.03$  h) when compared with the native sFv ( $t_{1/2} = 0.69 \pm 0.41$  h) plausibly corresponds to clearance by mannose-receptor bearing cells such as macrophages. The PEGylated glyco-sFv circulating life is extended 10-fold ( $t_{1/2} = 3.54 \pm 0.46$  h) when compared with the glyco-sFv (see Table II).

#### Discussion

The importance of N-linked glycosylation in influencing the *in vivo* biodistribution and serum half-life, the proper folding and stability and the activity of glycoproteins has brought a resurgence in the field of glycochemistry (Jenkins et al.,

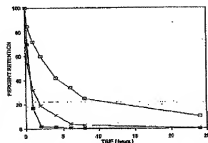


Fig. 5. Pharmacokinetics of plasma retention of CC49218 sFv, glyco-sFv and polyethylene glycol conjugate. Plasma residues of EN235 unmodified sFv (○), EN280 glyco-sFv (●) and EN280 glyco-sFv conjugated to PEG-5000 (■) were performed in mice (five per group) as described in Materials and methods.

Table II. Pharmacokinetics of sFv, glyco-sFv and conjugate

sFv	$t_{1/2}$ (h)	AUC (ng·h/mL)	MRT (h)
EN235	0.69 ± 0.41	54 ± 27	1.50 ± 0.59
EN280	0.39 ± 0.03	35 ± 1	0.96 ± 0.02
EN280/HC	3.54 ± 0.46	503 ± 31	5.54 ± 0.66

$t_{1/2}$ , circulating half-life; AUC, area under the curve; MRT, mean residence time.

1996). Many unanswered questions about the fundamental biochemistry of N-glycan processing still remain. Although the N-X-T/S sequon is used for nearly all N-glycan attachments, the presence of this tripeptide on a secreted protein does not ensure even partial modification at that specific site, and successful glycosylation of engineered proteins have been achieved empirically (Gavel and von Heijne, 1990; Cragg et al., 1993; Jenkins et al., 1996). Complications of known N-linked glycoproteins have led to two generalizations (Gavel and von Heijne, 1990). First, N-linked glycans are very uncommon within a few residues of a polypeptide C-terminal residue. Second, tandem or overlapping N-glycan sites are very uncommon in glycoproteins. Our reported results partially breaks these "rules" by achieving high-level secretion of fully active core-glycosylated or hyperglycosylated sFv proteins which have single or tandem N-glycan attachments 4–8 residues from the C-terminus. We speculate that outer chain  $\alpha$ -6 mannose elongation ("hypermannosylation") in the glyco-sFv tandem NKT variants may result from the kinetic effects of tandem N-glycan chain processing and/or an accompanying effect on the efficiency of the normal processing initiation and stop signals for outer chain elongation of the  $\alpha$ -6 mannose units (Hermans and Orlean, 1993). The optimal C-terminal location of the modification sites is fortuitous since the carboxyl terminus of the  $V_L$ -linker- $V_H$  single chain Fv protein is disaccharidically opposed to the antigen-binding site (see Figure 1A). Indeed, numerous bifunctional sFv fusion proteins have been produced via a direct C-terminal linkage.

The successful construction of biocognitive using sFv proteins and other therapeutic proteins which are attached to drug, polymer or effector molecules by random chemical

本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。  
取扱いにあたっては、著作権侵害等ならないよう十分にご注意ください。

## Glyco-iFv

linkages is often limited by a concomitant loss of binding affinity (e.g. Pettit *et al.*, 1997). The ability to secrete either core N-glycan modified iFv using a single N-X-T C-terminal site or hyperglycosylated iFv using a two- or three-site version was unexpected and provides much more versatility to the use of glyco-iFv in bioconjugate strategies. The potential uses of these glyco-iFv proteins in immunoconjugates may build upon the substantial foundation of carbohydrate-conjugated antibody/drug molecules presently in experimental and clinical trials (e.g. Rodwell *et al.*, 1986; Lempp *et al.*, 1995). Either minimal or extensive modifications of the glyco-iFv may be achieved depending on the length of the mannose chain. While we have shown a logarithmic increase in serum half-life of minimally PEGylated glyco-iFv, we have already achieved PEG-iFv ratios of 20:1 in active preparations of these conjugates and also expect that the use of longer PEG polymers will further extend serum half-life (Greenwald *et al.*, 1996). The circulating life of therapeutic single-chain Fv may ultimately be controllable by the choice of PEG-iFv bioconjugate.

The mannose-terminated iFv ("mannobodies") may also have interesting applications beyond bioconjugates. Considerable effort has been applied by several research groups in conjugating mannose to chemical and protein pharmaceuticals for specific targeting to mannose receptor bearing cells such as macrophages (Seymour, 1994). We anticipate that the glyco-iFv from *Spizantia* will display this targeting function, which may well correlate with the shortened mean residence time of these glycoproteins in serum. Furthermore, the targeting of foreign glyco-iFv to infected or cancerous cells might be employed clinically to provoke a hypersensitive rejection response of the diseased tissue. Engineering *Spizantia* to express glycosyltransferases from higher eukaryotes may ultimately provide further versatility. Additionally, the N-linked glycosylation designs described in this paper may have many applications in the selective (hyper)glycosylation of other therapeutic or diagnostic proteins. C-terminal tags, such as oligo(histidine) tails and other fusions, have proved to be of significant practical value in protein chemistry.

## Acknowledgements

We are grateful to Jeff McGuire, Rob Shon, Chyi-Lou, Kwok Shum and Rick Greenwald for their advice and encouragement.

## References

- Beggs, B.H. *et al.* (1996) *Nature Med.*, **2**, 879-884.  
Clegg, M.J., Vohlsch, T.S. and Rankin, W.C. (1995) *Biotechnology*, **13**, 565-610.  
Daly, C. *et al.* (1996) *Br. J. Cancer*, **75**, 115-122.  
Ribeiro, P., Ferra, M.S., Hinds, Y., Lin, D., Murray, M.P., Patel, J.R. and Patel, C.A. (1997) *J. Immunol. Methods*, **201**, 67-75.  
Eso-Amaguchi, E.A., Sauris, J., Boden, J.A., Stevens, S.K. and Burke, J.A. (1995) *Br. J. Cancer*, **73**, 1123-1127.  
Farrar, D. (1997) *Nature Biotechnol.*, **15**, 616-619.  
Filipidis, D., McMahon, J. and Whitlow, M. (1996) In *McCafferty, J., Rosenbaum, J. and Chan, D.J. (eds), Antibody Engineering: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 223-238.  
Givell, V. and van Halbeek, H. (1990) *Protein Engng.*, **3**, 433-442.  
Greenwald, R.B., Gillett, C.W., Frost, A., Green, C.D., Xu, J. and Mariani, A. (1996) *J. Med. Chem.*, **39**, 624-631.  
Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.  
Hartshorn, A.O. and Orlowski, J. (1993) *FASEB J.*, **7**, 540-550.  
McSweeney, H., Hsu, J.D., Hsu, S.M., Palm, J.C. and Frost, A.J. (1999) *Gene*, **221**, 51-59.  
Hilgert, W., Wenz, M., Punt, J.D., Balcan, R. and Wenz, G. (1997) *Nature Biotechnol.*, **15**, 630-636.

- Hogben, J.R. (1997) *Nature Biotechnol.*, **15**, 125-126.  
Jenkins, R., Pridmore, R.B. and Jones, D.C. (1998) *Nature Biotechnol.*, **16**, 575-581.  
Kahn, R.A., Wu, T.T., Perry, J.M., Gotsman, K.S. and Furlong, D. (eds) (1997) *Sequence of Protein of Immunological Interest*, 5th edn. US Department of Health and Human Services, Bethesda, MD.  
Kantam, J.R., Wang, M.O. and Witten, G. (1997) *Nature Biotechnol.*, **15**, 629-631.  
Kokomonis, M.A., Buehler, M.E. and Jackson, B.L. (1987) *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 315-344.  
Larsen, M. *et al.* (1997) *Cancer*, **80**, 2458-2468.  
Luo, D., Gong, M., Nijman, A.A. and Medendorp, R. (1997) *J. Biochem.*, **121**, 831-834.  
Lempp, S., Lemmon, M.A., Gervasio, R.V., Griffiths, G.L., Goldberger, D.M. and Thomsen, B.L. (1993) *J. Immunol.*, **151**, 5915-5926.  
Merkle, C. and Merkle, J.D. (1996) *N. Engl. J. Med.*, **335**, 720-724.  
Miles, R.G., Nilsson, S.L., Thoms, T., Hoffmann, R.K. and Cantelmo, R. (1997) *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **25**, 151-157.  
Mishra, D.R., Vohra, T., Filipidis, D.R., Farkas, M.A., Doolittle, W., Wood, J.J., Whitlow, M., Seng, J. and Schiller, J. (1993) *Cancer Res.*, **53**, 6363-6371.  
Nacci, M.L., Shum, R. and Aburkhanov, A. (1995) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **6**, 113-151.  
Pettit, J.K. *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 2312-2318.  
Ribeiro, P., Schmitt, R., Legay, F. and Gnan, H. (1995) *Biotechnology*, **13**, 255-260.  
Radwin, H.D., Albers, V.L., Lee, C., Lopez, A.D., Owen, W.O., King, M.D., Proulx, J.L. and McKinnon, J.I. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2632-2636.  
Seymour, L.N. *et al.* (1994) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **14**, 10-111.  
Whitlow, M. *et al.* (1995) *Protein Engng.*, **8**, 989-993.  
Whitlow, M., Filipidis, D., Rattmann, M.L., Frost, S.L. and Wood, J.J. (1994) *Protein Engng.*, **7**, 1017-1022.  
Whitlow, M., Howell, A.J., Wood, J.J., Voss, J.W., Jr and Hershman, J.R. (1995) *Protein Engng.*, **8**, 769-781.  
Wright, A. and Mariani, A. (1997) *Trends Biotechnol.*, **15**, 26-32.  
Zalysky, S. and McManus-Balazs, S. (1997) In *Marini, J.M. and Zalysky, S. (eds), Polysaccharide Chemistry and Biological Applications*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 313-341.

Received June 10, 1998; accepted September 15, 1998